Einfluß von Azadirachtin auf den Eireifungszyklus von *Locusta migratoria*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marianne Uhl
aus
Augsburg
Okt. 1987

UNIV.
LIBRARY
IRVINE

Einfluß von Azadirachtin auf den Eireifungszyklus von *Locusta migratoria*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marianne Uhl
aus
Augsburg
Okt. 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Renner
Sondergutachter: Prof. Dr. H. Rembold

Tag der mündlichen Prüfung: 6.6.1988

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Neuweiler danke ich für seine Betreuung innerhalb der Fakultät für Biologie der Universität München.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Insektenbiochemie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rembold für das Thema der Arbeit, seine wertvollen Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Ich danke ihm auch für die großzügige Bereitstellung der notwendigen Sachmittel.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 7
2.1. Chemikalien und Geräte 7
2.2. Tierhaltung 8
2.3. Applikation von Azadirachtin 9
2.4. Bestimmung des Hämolymphvolumens 9
2.5. Entnahme der Hämolymphproben 10
2.6. Bestimmung von Juvenilhormon 10
2.7. Bestimmung von Ecdysteroiden 13
2.8. Bestimmung von Vitellogenin 14
2.8.1. Bestimmung von Gesamtprotein 14
2.8.2. SDS-Disk-PAGE 14
2.8.3. Rocket-Immunelektrophorese 15

3. Ergebnisse 17
3.1. Juvenilhormontiter während der Larvenentwicklung im 4. und 5. Stadium 17
3.2. Untersuchung adulter Locusta migratoria-Weibchen 19
3.2.1. Juvenilhormon in der Hämolymphe während der ersten Tage nach der Adulthäutung 19
3.2.2. Effekt bei täglicher Hämolymphentnahme 20
3.2.3. Gleichzeitige Bestimmung von Ecdysteroiden und Juvenilhormon in der Hämolymphe 22
3.2.4. Juvenilhormonsäure 25
3.2.4.1. Bestimmung von Juvenilhormonsäure 25
3.2.4.2. Juvenilhormon III-Säure in biologischen Proben 26
3.2.5. Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen 27
3.2.6. Vitellogenin in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen 35
3.2.6.1. Einsetzen der Vitellogenese 35
3.2.6.2. Vitellogeninkonzentration in der Hämolymphe 36

UNIV. LEIPZIG BIBL.

3.3. Wirkung von Azadirachtin auf die Entwicklung adulter Locusta migratoria-Weibchen 40
3.3.1. Einfluß auf die Mortalität 40
3.3.2. Einfluß auf den Gewichtsverlauf 41
3.3.3. Einfluß auf die Eientwicklung 42
3.3.4. Wirkung von Azadirachtin auf die Hormontiter in der Hämolymphe 46
3.3.4.1. Hormontiter in der Hämolymphe von Weibchen ohne Oogenese 46
3.3.4.2. Hormontiter in der Hämolymphe von Weibchen mit verspäteter Eiablage 48
3.3.5. Wirkung von Azadirachtin auf die Vitellogenese 52
3.3.5.1. Vitellogenin in der Hämolymphe von Weibchen ohne Eientwicklung 52
3.3.5.2. Vitellogenin in der Hämolymphe von Weibchen mit verspäteter Eiablage 53
3.4. Wirkung von Hydropren auf mit Azadirachtin behandelte Locusta migratoria-Weibchen 56

4. Diskussion 58
4.1. Juvenilhormontiter in Larven von Locusta migratoria 58
4.2. Verlauf der Hormontiter in adulten Locusta migratoria Weibchen 59
4.2.1. Juvenilhormon 59
4.2.2. Ecdysteroide 61
4.3. Vitellogenintiter in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen 63
4.4. Hormontiter in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen und ihre Beziehung zur Eireifung 63
4.5. Wirkung von Azadirachtin auf adulte Locusta migratoria-Weibchen 67
4.5.1. Einfluß von Azadirachtin auf die Reproduktion 67
4.5.2. Einfluß von Azadirachtin auf die Hormontiter 69
4.5.3. Einfluß von Azadirachtin auf die Vitellogenese 70
4.6. Zum Wirkungsmechanismus von Azadirachtin 71

5. Zusammenfassung 76

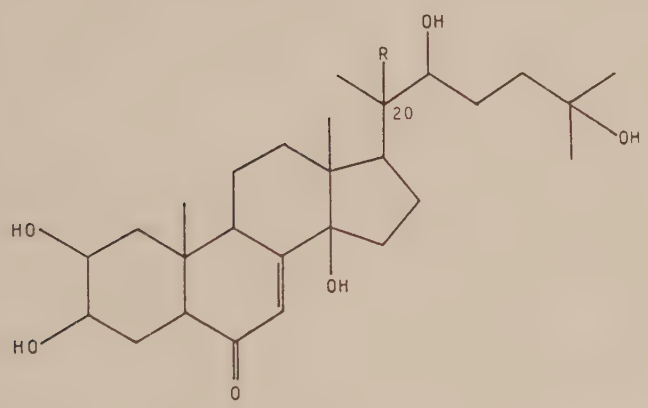
6. Literaturverzeichnis 78

Abkürzungen

ATH	Allatotropes Hormon
DMNFHSC	Dimethyl-(nonafluorhexyl)-sylilchlorid
dpm	Zerfälle pro Minute
ECD	Electron capture detection
FCTH	Follikelzellenstimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie
Hl	Hämolymphe
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
JH	Juvenilhormon
KD	Kilodalton
LTO	Länge der terminalen Oocyten
MIS	Multiple Ion Selection
MS	Massenspektroskopie
NCA	Nervus corpori allati (Nerv zwischen Corpus cardiacum und Corpus allatum)
NCC	Nervus corpori cardiaci (Nerv zwischen Gehirn und Corpus cardiacum)
Ptth	Prothorakotropes Hormon
RIA	Radioimmunoassay
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	selected ion monitoring

1. Einleitung

Kopeć (1917, 1922) und dann Wigglesworth (1934) erbrachten den ersten Nachweis einer hormonellen Entwicklungssteuerung bei Insekten. Kopeć (1922) schloß aus seinen Experimenten an Lymantria dispar, daß das Gehirn auch die Funktion einer endokrinen Drüse hat. Diese These wurde durch Wigglesworth (1940) bewiesen. Er wies nach, daß die Häutung bei Rhodnius prolixus durch einen humoralen Faktor aus dem Gehirn induziert wird. Williams (1947) zeigte schließlich, daß die Prothoraxdrüsen das Zielorgan des prothorakotropen Hormons (PTTH) sind und nach Stimulierung das eigentliche Häutungshormon ausschütten. Das Ecdyson wurde von Butenandt und Karlson (1954) aus Bombyx isoliert und seine vollständige Struktur 1965 aufgeklärt (Karlson et al., Huber und Hoppe). Die biologisch aktive Form dieses Steroidhormons (Abb. 1) ist das 20-Hydroxy-Ecdyson (Karlson, 1956; Hoffmeister und Grützmacher, 1966).

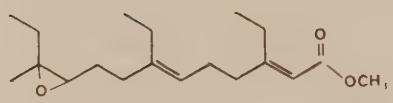


R = H: Ecdyson

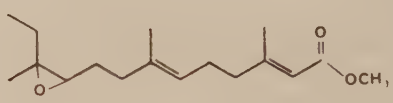
R = OH: 20-Hydroxy-Ecdyson

Abb. 1: Struktur von Ecdyson und 20-Hydroxy-Ecdyson.

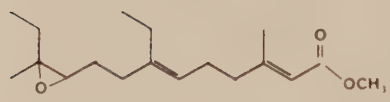
Wigglesworth (1934, 1936) wies ein weiteres Insektenhormon nach, das von den Corpora allata abgegeben wird. Es erhielt den Namen Juvenilhormon nach seiner Funktion, während der Larvalentwicklung die Metamorphose zu verhindern. Nach der Isolierung und Strukturaufklärung des ersten Juvenilhormons (JH I) durch Röller et al. (1967) und Dahm et al. (1967) wurden weitere natürlich vorkommende Juvenilhormone gefunden (Abb. 2). Sie sind Sesquiterpene, die sich formal vom Farnesensäuremethylester ableiten. JH III ist in vielen Insektenordnungen das einzige Juvenilhormon, während JH I und JH II ausschließlich in Lepidopteren vorkommen (Schooley et al., 1984; Rembold und Lackner, 1985). Nur in Embryonen von Manduca sexta wurden bisher JH 0 und ein weiteres Homologes, das 4-Methyl-JH I, gefunden.



JH 0

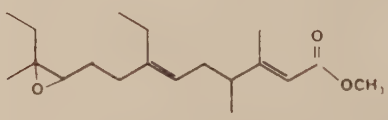


JH II



JH I

JH III



4-Methyl-JH I

Abb. 2: Struktur von natürlich vorkommenden Juvenilhormonen.

20-Hydroxy-Ecdyson hat einen für Steroidhormone typischen Wirkungsmechanismus. Es bindet an cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren und reguliert spezifische Genaktivitäten (Übersicht: Koolman und Spindler, 1983). Für das Juvenilhormon wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus angenommen. Hinweise darauf sind seine Fähigkeit, die Vitellogenin-mRNA-Synthese zu stimulieren (Chinzei et al., 1982) und die Existenz von JH-Bindungsproteinen im Cytosol und im Zellkern (Koeppe und Kovalick, 1986).

Das Hormonsystem der Insekten ist wie bei den Vertebraten hierarchisch aufgebaut. Übergeordnetes Zentrum ist das Gehirn. Vor allem in der Pars intercerebralis werden Neurosekrete gebildet, die über Neurohämalorgane, die Corpora cardiaca, in die Hämolymphe ausgeschüttet werden. PTTH (prothorakotropes Hormon) und ATH (allatotropes Hormon) induzieren die Synthese der peripheren Hormone Ecdyson und Juvenilhormon. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Neuropeptide, die Stoffwechselprozesse oder Verhaltensweisen der Tiere steuern.

Für das Zusammenspiel von Juvenilhormon und 20-OH-Ecdyson während der Larvalentwicklung und Metamorphose wurde, basierend auf klassischen Techniken der Endokrinologie (Extirpation, Implantation, Ligation oder Parabiose) ein bis heute gültiges Modell entwickelt (z.B. Wigglesworth, 1966): 20-Hydroxy-Ecdyson induziert den Häutungsprozeß, Juvenilhormon bestimmt die Art der Häutung. Eine gleichzeitige Ausschüttung beider Hormone bewirkt eine Larven-Larven-Häutung, während niedrige Juvenilhormontiter oder völlige Abwesenheit von JH eine Verpuppung bzw. Adulthäutung zur Folge haben.

Im erwachsenen Tier haben beide Hormone Funktionen bei der Reproduktion (Übersicht: Koeppe et al., 1985; Hagedorn, 1985). Juvenilhormon induziert die Synthese von Vitellogenin (Vorstufe des Eidotterproteins Vitellin) im Fettkörper und dessen Aufnahme in die Oocyten (Abb. 3, Übersicht: Engelmann, 1983). Ecdysteroide werden im Ovar synthetisiert und in verschiedenem Ausmaß auch in die Hämolymphe sezerniert. Ihre Rolle bei der Eireifung ist noch weitgehend unklar. Bei bestimmten Dipterenarten kontrolliert 20-OH-Ecdyson die Vitellogenese (Hagedorn, 1985). Bei <u>Locusta migratoria</u> wird

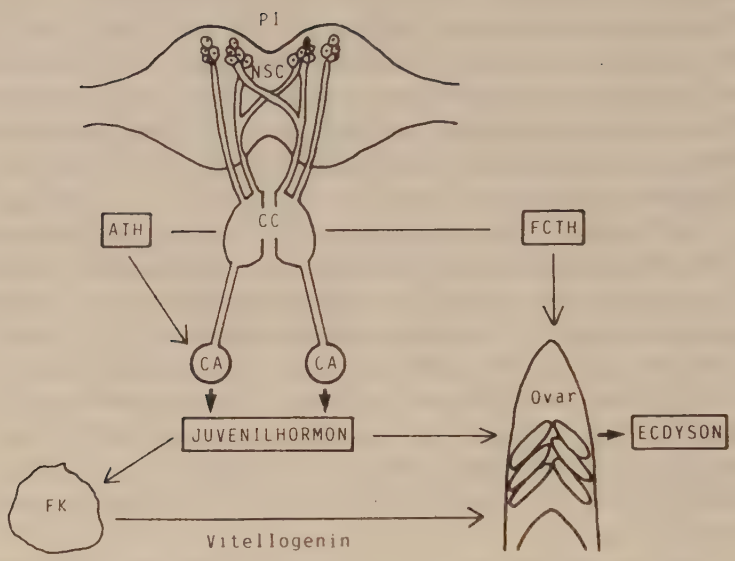


Abb. 3: Schematische Darstellung der endokrinen Steuerung der Oogenese bei Insekten am Beispiel von Locusta migratoria. PI: Pars intercerebralis, NSC: neurosekretorische Zellen, CC: Corpora cardiaca, CA: Corpora allata, ATH: allatotropes Hormon, FCTH: Follikelzellen-stimulierendes Hormon, FK: Fettkörper

der Großteil der Ecdysteroide in Konjugatform in den Eiern gespeichert, wo sie eine Funktion bei den Embryonalhäutungen haben (Lagueux et al., 1979). Außer bei Dipteren ist sehr wenig über die wechselseitigen Beziehungen der beiden Hormone während der Eireifung bekannt. Bei Diploptera punctata und Nauphoeta cinerea werden Feedback-Mechanismen zwischen Ecdyson und Juvenilhormon vermutet, wobei Ecdyson gegen Ende der Eireifung die Juvenilhormonsynthese hemmen soll (Stay et al., 1980; Lanzrein et al., 1981).

Für die Aufklärung des Zusammenwirkens von Juvenilhormon und Ecdyson ist zunächst die Kenntnis der Hormontiter erforderlich. Die Quantifizierung von Hormonen in der Hämolymphe war erst möglich mit der Einführung hoch empfindlicher Techniken, wie den Radioimmunoassays für Ecdysteroide (z.B. Borst und O'Connor, 1972) oder Juvenilhormone (z.B. Strambi et al., 1981). Der Lipidcharakter des Juvenilhormonmoleküls erschwert aber die Bestimmung mit Hilfe eines RIA. Meist werden daher die Juvenilhormontiter mit komplizierteren, physiko-chemischen Methoden (Gaschromatographie und Massenspektroskopie, Bergot et al., 1981a; Rembold und Lackner, 1985) gemessen. Aus diesem Grund sind die Titer von Juvenilhormon bisher in einer weit geringeren Zahl von Insektenarten bestimmt worden als Ecdysteroidtiter.

Hormontiter resultieren aus verschiedenen Faktoren: Biosynthese- und Freisetzungsraten, Metabolismus, Exkretion und Aufnahme des Hormons im Gewebe. Als übergeordnetes Koordinationssystem fungieren nervöse und neurosekretorische Zentren, die auf Signale aus der Umwelt und solche aus dem Organismus reagieren. Bei den letzteren spielen positive oder negative Rückkopplungsmechanismen eine wichtige Rolle. So können Konzentrationsänderungen eines Hormontiters stimulierend oder hemmend auf die Biosynthese des betreffenden, aber auch eines anderen Hormons wirken.

Azadirachtin (Abb. 4) ist eine Substanz, welche die hormonelle Steuerung von Entwicklungsvorgängen bei Insekten beeinflußt.

Es ist ein natürlicher Pflanzeninhaltsstoff aus dem indischen Neem-Baum (Azadirachta indica A. Juss), der zunächst durch seine fraßabschreckende Wirkung bekannt wurde (Butterworth und Morgan, 1968). Dieser Effekt wird seit langem praktisch genutzt, indem Rohextrakte aus Blättern und Früchten des Neem-Baumes im Pflanzenschutz eingesetzt werden. Darüber hinaus ruft Azadirachtin Metamorphosestörungen (Ruscoe, 1972; Rembold et al., 1981; Schmutterer und Rembold, 1980) und Reproduktionshemmung (Steets und Schmutterer, 1975; Rembold und Sieber, 1981; Koul, 1984b) hervor. Bei Tieren, die mit Azadirachtin behandelt wurden, beobachtet

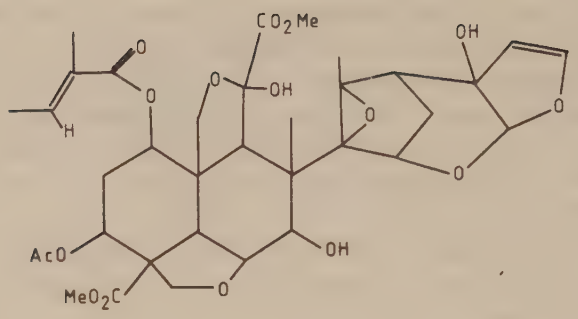


Abb. 4: Struktur von Azadirachtin (nach Kraus et al., 1985).

man Veränderungen im Ecdysteroidtiter (Redfern et al., 1982; Sieber und Rembold, 1983; Schlüter et al., 1985; Dorn et al., 1986; Garcia et al., 1986; Mordue et al., 1986). Der Wirkungsmechanismus von Azadirachtin ist noch nicht geklärt. Verschiedene Autoren interpretieren die Azadirachtin-Effekte als eine Interaktion mit neurosekretorischen Zentren (z.B. Rembold, 1984; Dorn et al., 1986; Subrahmanyam und Rao, 1986; Koul et al., 1987).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlauf der Juvenilhormontiter in der Hämolymphe von Locusta migratoria zunächst in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Dann wurde in der Hämolymphe erwachsener Weibchen während der Eireifung nebeneinander der Titerverlauf von Juvenilhormon und Ecdysteroiden ermittelt. Nach Injektion von Azadirachtin sollte geprüft werden, in welcher Weise die beiden Hormone beeinflußt werden und ob aus diesem Verhalten ein Einblick in die wechselseitigen Beziehungen von Juvenilhormon und Ecdyson während der Eireifung möglich ist. Um den Zusammenhang zwischen den beiden Hormontitern möglichst genau zu erfassen, wurde ihr Verlauf kontinuierlich am Einzeltier verfolgt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

- Bio-Rad (München): Protein Assay Dye Reagent Concentrate
- LKB (München): Aqualuma plus, Agarose
- Mallinckrodt (Paris, U.S.A.): Ethylacetat, Cyclopentan, Dichlormethan, Isooktan, Pentan, Toluol (alle "Nanograde")
- NEN (Dreieichenhain): 10-^{3}H-Juvenilhormon III (spezifische Aktivität 11 Ci/mmol), 23,24-^{3}H-Ecdyson (spezifische Aktivität 58,8 Ci/mmol), ^{14}C-Carboxyinulinsäure (spezifische Aktivität 7,92 Ci/mmol)
- Serva Feinbiochemika (Heidelberg): Coomassie Brilliant Blue R-250, Ecdyson, 20-Hydroxy-Ecdyson
- Sigma Chemie (Taufkirchen): Juvenilhormon III, Myosin, ß-Galaktosidase, Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Carbanhydrase
- Woelm Pharma (Eschwege): Aluminiumoxid Typ W 200, Aktivität III, neutral
- Merck (Darmstadt): alle anderen Chemikalien, Reinheitsgrad "p.A."
- Es wurde ausschließlich aqua bidest. verwendet
- Radioaktiv markierte Juvenilhormonsäure wurde folgendermaßen hergestellt:

^{3}H-Juvenilhormon III (1 µCi) wurde in 1 ml Methanol/1 N NaOH (1:1) bei 40° C im Dunkeln hydrolysiert. Die Kinetik der Hydrolyse wurde verfolgt, indem stündlich Aliquots entnommen wurden und der Prozentsatz des noch vorhandenen Juvenilhormons bestimmt wurde. Juvenilhormon wurde dazu mit Isooktan aus der wässrigen Phase extrahiert und die Radioaktivität in beiden Phasen im Szintillationszähler gemessen. Nach vierstündiger Inkubation unter ständigem Rühren war die Verseifung von Juvenilhormon zu 96% erfolgt. Noch vorhandenes Juvenilhormon wurde mit 3 x 0,5 ml Isooktan extrahiert.

Nach vorsichtigem Ansäuern mit 1 N HCl auf pH 5,0 wurde die JH III-Säure mit Chloroform aus der wässrigen Phase extrahiert, das Lösungsmittel mit Helium abgeblasen und der Rückstand in Methanol aufgenommen.

10 mg unmarkiertes Juvenilhormon III wurde in 5 ml Methanol/ 1N NaOH (1:1) in gleicher Weise verseift und die Identität der Säure durch H-NMR-Spektroskopie* bestätigt.

- Diazomethan wurde nach Crotte et al. (1970) hergestellt

Geräte

- Kontron (München): Betamatic II (Liquid Scintillation Counter)
- LKB (Bromma, Schweden): Multiphor 2117 für Immunelektrophoresen, System 2001 für vertikale Elektrophoresen
- Christ (Osterode): Sigma 2 Mk (gekühlte Minifuge)

2.2. Tierhaltung

Locusta migratoria migratorioides (Reiche und Farm) wurde in mit feinem Maschendraht bespannten Holzkäfigen (30 cm x 50 cm x 50 cm) gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 45 %. Als Licht- und Wärmequelle diente eine 60 Watt-Glühbirne. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12:12 Stunden, die Temperatur am Käfigboden 33° C (Licht) bzw. 24° C (Dunkel). Zur Eiablage standen Plastikschalen (Vitri, Mühltal; 20 cm x 10 cm x 8 cm) mit feuchtem Aquariensand zur Verfügung. Eigelege wurden zweimal täglich abgesammelt und im Brutschrank bei 30° C und 60 % Luftfeuchtigkeit ausgebrütet. Als Nahrung erhielten die Tiere täglich frische Weizenkeimlinge und Weizenkleie.

---

* Frau Schild, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Messungen

Da die afrikanische Wanderheuschrecke einen Phasenpolymorphismus aufweist, bei dem zwischen gregärer und solitärer Phase Unterschiede in der Morphologie und der Entwicklungskinetik auftreten, wurden die Tiere durch annähernd konstante Populationsdichten in der Wanderphase gehalten. Die Anzahl der Individuen pro Käfig lag für adulte Heuschrecken bei etwa 25 Tieren.

Adulte Weibchen wurden stets zusammen mit älteren Männchen gehalten, weil deren Anwesenheit die Geschlechtsreifung der Weibchen stimuliert.

Nach einer Häutung wurden die Tiere datiert (in der Regel mit einer Genauigkeit von ± 4 Stunden) und mit Farbmarken gekennzeichnet. Versuchstiere wurden zusätzlich mit Nummern auf Klebeband am Flügel versehen.

2.3. Applikation von Azadirachtin

Azadirachtin A wurde auf einer Feinstanalysenwaage eingewogen, in 16% Ethanol aufgenommen und mit 84% Wasser auf 100% aufgefüllt. Die Reinheit der Lösungen wurde regelmäßig durch Dünnschichtchromatographie oder HPLC überprüft. Azadirachtinlösungen wurden den Tieren mit einer 10 µl-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch die Intersegmentalhaut zwischen dem 2. und 3. Abdominalsegment injiziert. Vor der Injektion wurden die Heuschrecken mit CO_2 betäubt. Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge Lösungsmittel. Maximal wurden 6 µl injiziert; bei größeren Volumina kommt es vor, daß die Tiere einen Teil der verabreichten Lösung wieder herausdrücken.

2.4. Bestimmung des Hämolymphvolumens

Hämolymphvolumina wurden mit ^{14}C-Carboxyinulinsäure (spez. Aktivität 7,92 Ci/mmol; NEN, Dreieichenhain) ermittelt. Dieses Polysaccharid ist metabolisch inert und wird nicht ausgeschieden. Es verbleibt im extrazellulären Raum. Erst nach 24 Stunden kann eine Anreicherung im Gewebe festgestellt werden (Loughton und Tobe, 1969).

Die Versuchstiere wurden gewogen und mit jeweils 2,5 µl ^{14}C-Carboxyinulinsäurelösung (= 138750 dpm) injiziert. Nach 30 Minuten wurden 10 µl Hämolymphe mit einer Mikropipette abgenommen und in Szintillationsgefäßen mit 8 ml Aqualuma plus (LKB) gemischt. Die Proben wurden im Szintillationszähler (Kontron) gemessen. Aus der Verdünnung des Inulins errechnet sich das Hämolymphvolumen.

2.5. Entnahme der Hämolymphproben

Hämolymphe wurde hinter dem Sprungbein am Metathorax entnommen. Die Intersegmentalhaut wurde mit einer Nadel durchstochen und die austretende Hämolymphe mit einer 10 µl-Mikropipette (Brand, Wertheim) aufgenommen.

Proben zur gleichzeitigen Bestimmung von Juvenilhormon und Ecdysteroiden wurden in 1 ml eiskaltem Methanol aufgenommen. Nach gründlichem Mischen wurde der interne Standard der JH-Bestimmung (siehe 2.6.) zugefügt und wiederum gut gemischt.

Proben für Vitellogeninbestimmungen wurden in eiskalten Puffer pipettiert (siehe 2.8.).

Bis zur Aufarbeitung wurden die Hämolymphproben bei -18°C aufbewahrt.

2.6. Bestimmung von Juvenilhormon

Juvenilhormon wurde mit der GC-MS Technik nach Rembold und Lackner (1985) bestimmt. Bei dieser Methode wird Juvenilhormon in zwei Stufen zu einer Verbindung mit höherem Molekulargewicht (10-[Dimethyl(nonafluorhexyl)silyloxy]-11-methoxy-JH) derivatisiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Gaschromatographie in direkter Kopplung mit einem Massenspektrometer. Das JH-Derivat liefert die analytischen Fragmente bei der Messung unter SIM (selected ion monitoring)-Bedingungen (Abb. 5). Die Berechnung der Juvenilhormonkonzentrationen geschieht über einen internen Standard (JH-Ethylester), der bei der gesamten Aufarbeitung mitgeführt wird und sich identisch mit Juvenilhormon verhält.

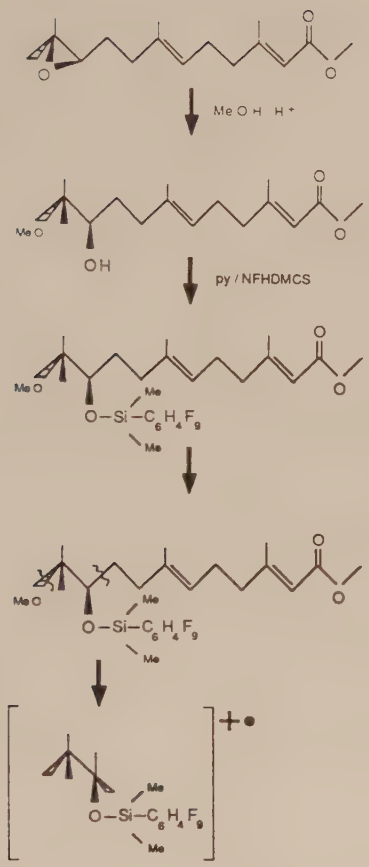


Abb. 5: Herstellung des JH-III-Analyten (nach Rembold und Lackner, 1985). Das gezeigte Fragment entsteht bei Elektronenstoßionisation und liefert das analytische Signal bei m/z 376.

Das Schema der Aufarbeitung ist in Abbildung 6 dargestellt. Bei der Isolierung von Juvenilhormon aus ganzen Tieren wurde der Rohextrakt über LiChroprep RP-8 (Merck, Darmstadt) filtriert. Dabei wurde ein Großteil der Lipide entfernt. Dieser Schritt ist bei Hämolymphproben eines kleinen Volumens nicht erforderlich. 10 µl Hämolymphe wurde in 1 ml eiskaltes Methanol pipettiert und 10 pmol interner Standard (JH III- und JH I- Ethylester) anschließend zugesetzt.

1. Tiermaterial homogenisieren (Ultra-Turrax, 0°C, 10 ml MeOH)
   zentrifugieren (Minifuge Christ, 4000 UpM, 0°C, 10 min)
   Pellet 2 x reextrahieren, Überstände vereinigen (30 ml)
   JH-Ethyl-Standard zufügen (10 pmol)
   verdünnen mit 30 ml wässriger NaCl
   zentrifugieren (4000 UpM, 0°C, 5 min)

2. Filtration durch LiChroprep RP-8 (0,75 g)
   äquilibrieren: 2 x 2,5 ml Ethylacetat
   2 x 2,5 ml MeOH
   2 x 2,5 ml MeOH/2% wässrige NaCl (1:1)
   Extrakt aufgeben
   waschen: 2 x 5 ml MeOH/2% wässrige NaCl (1:1)
   trockensaugen
   eluieren: 3 ml MeOH

3. 1:1 mit wässriger NaCl verdünnen (3 ml; für Hämolymphproben 1 ml)
   extrahieren mit 3 x 0,5 ml Isooktan (zur Phasentrennung zentrifugieren)
   organischen Extrakt mit 0,25 ml 2% wässriger NaCl waschen

4. Filtration durch Aluminiumoxid (1,3 g)
   waschen: 2 ml Isooktan
   Extrakt aufgeben
   waschen: 1 ml Isooktan
   2 ml Dichlormethan/Pentan (3:7)
   eluieren: 2 ml Dichlormethan
   trocknen mit Helium

5. 10-Hydroxy-11-methoxy-JH-Derivatisierung
   Probe in 0,075 ml MeOH aufnehmen
   0,075 ml 5% Essigsäure in MeOH unter Schütteln zugeben
   15 min bei 60°C in geschlossenem Gefäß inkubieren
   mit Helium trocknen, unter Zugabe von 2 x 1 ml Pentan
   aufnehmen in 1 ml Isooktan

6. Filtration durch Aluminiumoxid (1,3 g)
   waschen: 1 ml Isooktan
   Probe aufgeben
   waschen: 1 ml Isooktan
   2 ml Dichlormethan
   eluieren: 2 ml Ethylacetat/Pentan (1:1)
   trocknen mit Helium

7. 10-[Dimethyl(nonafluorohexyl)silyloxy]-11-methoxy-JH-Derivatisierung
   Probe in 0,1 ml Pyridin aufnehmen
   0,025 ml DMNFHSC [= Dimethyl(nonafluorhexyl)silylchlorid] zugeben
   (unter Schütteln)
   20 min bei 60°C in geschlossenem Gefäß inkubieren
   1 ml Pentan zugeben

8. Filtration durch Aluminiumoxid (0,5 g)
   waschen: 2 ml Dichlormethan
   Probe aufgeben und Durchlauf sammeln
   vollständige Elution mit 1 ml Dichlormethan/Pentan (2:3)
   mit Helium trocknen, unter Zugabe von 3 x 1 ml Pentan

9. Filtration durch Aluminiumoxid (1,3 g)
   waschen: 2 ml Dichlormethan
   2 ml Isooktan
   Probe aufgeben
   waschen: 0,5 ml Isooktan
   2 ml Toluol/Isooktan (15:85)
   1 ml Pentan
   eluieren: 2 ml Dichlormethan/Pentan (2:3)
   trocknen mit Helium

10. Filtration durch Aluminiumoxid (1,3 g)
    wie 9.

11. Probe in 0,05 ml Cyclopentan aufnehmen
    GC-MS-MIS-Analyse

Abb. 6: Aufarbeitungsschema zur Herstellung des JH-Analyten und zur Bestimmung von Juvenilhormon.

Die weitere Aufarbeitung ist für Hämolymphproben und Ganztierextrakte identisch. Die mit der Derivatisierung verbundenen Polaritätsänderungen des JH-Moleküls und des Standards ermöglichen die Abtrennung störender Stoffe durch Filtration an Aluminiumoxid (Woelm Pharma, Eschwege; Typ W 200, Aktivität III, neutral).

Mit Ausnahme von Methanol p.a. (Merck) wurden nur "Nanograde" Lösungsmittel von Mallinckrodt verwendet. Während der gesamten Aufarbeitung wurden Glaswaren benutzt, die vor Gebrauch bei 240°C ausgeheizt wurden. Die Reaktionsgefäße waren mit Teflonverschlüssen versehen.

Jeweils 10 Proben konnten gleichzeitig aufgearbeitet werden. Neben 9 biologischen Proben wurde stets eine Leerprobe mitgeführt, die nur den inneren Standard enthielt.

Für GC-MS-Messungen wurden ein Varian CH-7A-DF Massenspektrometer in direkter Kopplung an einen IGC 120 DFL-Gaschromatographen (Intersmat, Courtry) und ein SS 100 Computer verwendet. Für die Injektion wurde ein Falling-Needle-Injector (LKB, Bromma) benutzt; die Trennung der JH-Derivate erfolgte auf einer Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm, fused silica, stationäre Phase DB 1, Schichtdicke 0,25 µm; J&W, Rancho Cordova). Die Temperatur des Injektors lag bei 300° C, die Ofentemperatur bei 245° C.

2.7. Bestimmung von Ecdysteroiden

In der Hämolymphe enthaltene Ecdysteroide wurden mit Hilfe eines RIA nach Borst und O'Connor (1974) und Spindler et al. (1978) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Kompetition zwischen radioaktiv markiertem und unmarkiertem Antigen um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers.

Verdünnungen der Proben in Methanol wurden in Eppendorf-Gefäßen bei 40° C getrocknet und eine definierte Konzentration von 23,24-^{3}H-Ecdyson (spez. Aktivität 58,8 Ci/mmol; NEN, Dreieichenhain) in Boratpuffer (0,1 M Borsäure, 0,1 M Natriumtetraborat, 0,075 M NaCl; pH 8,4) zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben über Nacht bei 4° C

mit ICT-1 Antiserum* inkubiert. Der gebildete Antigen-Antikörperkomplex wurde in der Kälte mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und abzentrifugiert (12000 UpM, 5 min, 4° C). Der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag in 40 µl Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 800 µl Szintillator (Aqualuma plus, LKB) wurde die Aktivität der Probe in einem Betamatic II (Kontron) gemessen.

Die Antigenkonzentrationen in den biologischen Proben wurden nach Eichkurven ermittelt, die mit bekannten Ecdysonmengen (Serva, Heidelberg) erstellt wurden. Der Antigengehalt der Proben wurde deshalb in Ecdysonäquivalenten angegeben. Er umfaßt alle Ecdysteroide, die wie Ecdyson oder 20-Hydroxy-Ecdyson mit dem Antikörper kreuzreagieren (siehe dazu auch Reum et al., 1979).

2.8. Bestimmung von Vitellogenin

Hämolymphproben wurden sofort nach der Entnahme mit eiskaltem Puffer (0,1 M Phosphat; 0,15 M NaCl; pH 7,0) fünffach verdünnt und bei 4° C zentrifugiert (12000 UpM, 5 min), um Hämocyten zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Aufarbeitung bei - 18° C aufbewahrt.

2.8.1. Bestimmung von Gesamtprotein

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) mit dem Mikroassay von Bio-Rad (München) bestimmt.

2.8.2. SDS-Disk-PAGE

Zur qualitativen Bestimmung von Vitellogenin in der Hämolymphe wurde die SDS-Disk-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit diskontinuierlichen Gelen) nach Laemmli (1970) angewandt. Für die Analysen wurde das LKB-System 2001 für vertikale Elektophoresen benutzt und

---

*freundlicherweise von Prof. K.-D. Spindler, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt

nach zugehöriger Anleitung verfahren.

Die Gele bestanden aus einem 3%-igen Sammelgel und einem 10%-igen Trenngel. Der Elektrodenpuffer (pH 8,3) enthielt 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin und 1% SDS, der Probenpuffer (pH 6,8) 0,0625 M Tris, 15% Glycerin, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol und 0,001% Bromphenolblau.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 20 mA in einer gekühlten Elektrophoresekammer.

Als Molekulargewichts-Marker wurden Standards von Sigma verwendet: Myosin (MW 205000), ß-Galaktosidase (MW 116000), Phosphorylase b (MW 97400), Rinderserumalbumin (MW 66000), Ovalbumin (MW 45000) und Carbanhydrase (MW 29000).

Die Proteine wurden mit Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, Heidelberg) angefärbt.

2.8.3. Rocket-Immunelektrophorese

Die Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) wurde zur quantitativen Bestimmung von Vitellogenin angewandt. Diese Methode basiert auf der elektrophoretischen Mobilität eines Antigens und seiner spezifischen Immunpräzipitation durch einen Antikörper. Die Elektrophorese findet in einem Agarosegel statt, welches Antikörper enthält. Bei pH 8,6 sind diese fast immobil. Während der Elektrophorese entsteht ein charakteristisch geformtes Präzipitat (Rocket), dessen Fläche proportional zur Konzentration des Antigens ist.

Für die Analyse wurde das LKB 2117 Multiphorsystem verwendet und nach Anleitung von LKB verfahren. Der Tris-Barbiturat-Puffer (pH 8,6) wurde als Konzentrat angesetzt (44,3 g Tris, 22,4 g Diethylbarbitursäure, 0,533 g Calciumacetat, 0,65 g NaN_3 in 100 ml Aqua bidest.) und vor Gebrauch 1:4 verdünnt. Die 1%-igen Agarosegele enthielten 30 µl Vitellogenin-Antiserum*. Als Standard wurde reines Vitellogenin* oder Hämolymphe mit definierter Vitellogeninkonzentration eingesetzt.

---

*freundlicherweise von Dr. C. Beckers, Universität Darmstadt, zur Verfügung gestellt

Als Probe wurde 10 µl verdünnte Hämolymphe aufgetragen. Nach der Elektrophorese (7,5 Stunden bei 5 V/cm und 10° C) wurden die Gele mit 0,1 M NaCL gewaschen (2 x 15 min) und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Juvenilhormontiter während der Larvenentwicklung im 4. und 5. Stadium

Der Juvenilhormontiterverlauf in Locusta-Larven wurde untersucht. Dafür wurden Hämolymphproben von Weibchen des vierten und fünften sowie von Männchen des vierten Stadiums vermessen.

Wegen der extrem niedrigen JH III-Konzentrationen wurde für jede Bestimmung Hämolymphe (zwischen 150 und 250 µl) von jeweils 30 datierten (± 4 Stunden) Larven gesammelt. Bei den weiblichen Larven des 4. Stadiums (Abb. 7) ist die JH III-Konzentration in der zweiten Hälfte des Stadiums, an Tag 3, mit 1,65 pmol/100 µl am höchsten.

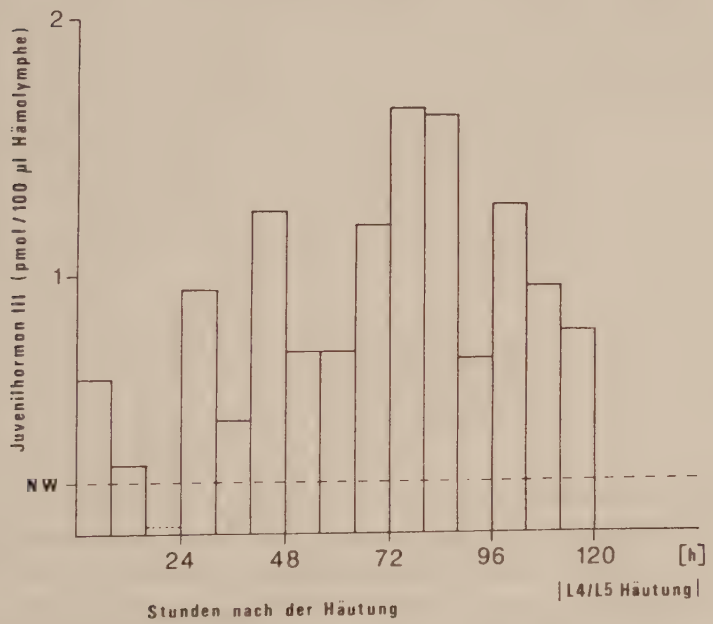


Abb. 7: Juvenilhormontiter in der Hämolymphe weiblicher Locusta-Larven im 4. Larvalstadium. Es sind Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen angegeben. Die Meßwerte der Parallelbestimmungen differierten um 0,05 bis maximal 0,1 pmol. NW = Nachweisgrenze.

Hämolymphe von männlichen Tieren enthält das JH III im selben Konzentrationsbereich (Tab. 1). Der höchste Wert wurde hier ebenfalls an Tag 3 gemessen; er betrug 2,42 pmol/ 100 µl.

Tab. 1 : Konzentration von JH III in der Hämolymphe männlicher Locusta-Larven des 4.Stadiums. Es sind Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen angegeben. Die Meßwerte der Parallelbestimmungen differierten um 0,05 bis maximal 0,1 pmol.

Stunden nach letzter Häutung (±4 h)	JH III pmol/100 µl
24	1,05
48	1,35
60	1,14
72	2,42
84	1,19
96	1,13
108	1,33

Im 5. Larvenstadium wurden nur Weibchen untersucht. Der Juvenilhormongehalt liegt, bezogen auf 100 µl Hämolymphe, stets an der Nachweisgrenze oder tiefer. Ab Tag 5 bis zur Adulthäutung der Tiere (Tag 6-7) wurde JH III auch nicht mehr in Spuren gefunden.

Die Aufarbeitung ganzer Tiere bestätigte die niedrigen Hämolymphwerte (Tab. 2). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß auch bei exakt datierten Tieren große individuelle Schwankungen im Hormongehalt auftreten.

Tab. 2: Konzentration von JH III in einzelnen Locusta-Weibchen des 4.und 5. Larvenstadiums (Ganztierextrakt).

Stadium	Stunden nach letzter Häutung (± 30 min)	JH III pmol/g
L 4	27	0 / 1,32 / 2,64
	48	0 / 0 / 1,51
	69	0,2 / 1,53
	70	1,56
	85	0,2 / 1,32 / 2,39
	105	1,37/ 1,68
L 5	48	0 / 0
	72	0 / 0

3.2. Untersuchung adulter Locusta migratoria-Weibchen

3.2.1. Juvenilhormon in der Hämolymphe während der ersten Tage nach der Adulthäutung

Die Untersuchung gepoolter Hämolymphproben von adulten Weibchen zeigt, daß die Juvenilhormontiter während der ersten Tage nach der Adulthäutung sehr niedrig sind (Tab. 3). Nach drei Tagen lagen die Konzentrationen, bezogen auf 10 µl Hämolymphe, deutlich über der Nachweisgrenze von 0,2 pmol JH III. Damit war eine Einzeltierbestimmung ab Tag 4 möglich. Für diese Messungen (Tab. 3) wurde bei vierzehn Tieren individuell täglich je 10 µl Hämolymphe entnommen.

Tab. 3: Konzentration von Juvenilhormon III in gepoolter Hämolymphe aus vierzehn adulten Locusta-Weibchen

Tag nach Adulthäutung	pmol JH III/10 µl Hämolymphe
1	0,1
2	0,16
3	0,12
4	1,08
5	1,05
6	2,04

3.2.2. Effekt bei täglicher Hämolymphentnahme

Zwei Gruppen von jeweils 10 datierten adulten Weibchen wurden täglich zur selben Zeit gewogen. Den Tieren der Versuchsgruppe wurden dabei individuell je 10 µl Hämolymphe entnommen.

Untersuchungen an weiteren Weibchen zeigten, daß diese Hämolymphmenge in der Regel weniger als 3% des Gesamtvolumens entspricht (Tab. 4).

Tab. 4: Hämolymphvolumen adulter Locusta-Weibchen an verschiedenen Tagen des ersten Eireifungzyklus

Tag nach Adulthäutung	Hämolymphvolumen (µl)	n
1	390 ± 62	6
3	350 ± 32	4
7	325 ± 33	4
10	423 ± 101	5
12	400 ± 45	3

Die Hämolymphentnahme beeinträchtigte die Tiere nicht in ihrer Entwicklung. Weder im Gewichtsverlauf (Abb. 8) noch in der Dauer des ersten Eireifungszyklus (Tag 12 bis Tag 13) traten Unterschiede zu den Kontrolltieren auf. Aus den Gelegen schlüpften die Larven übereinstimmend nach zehn bis zwölf Tagen.

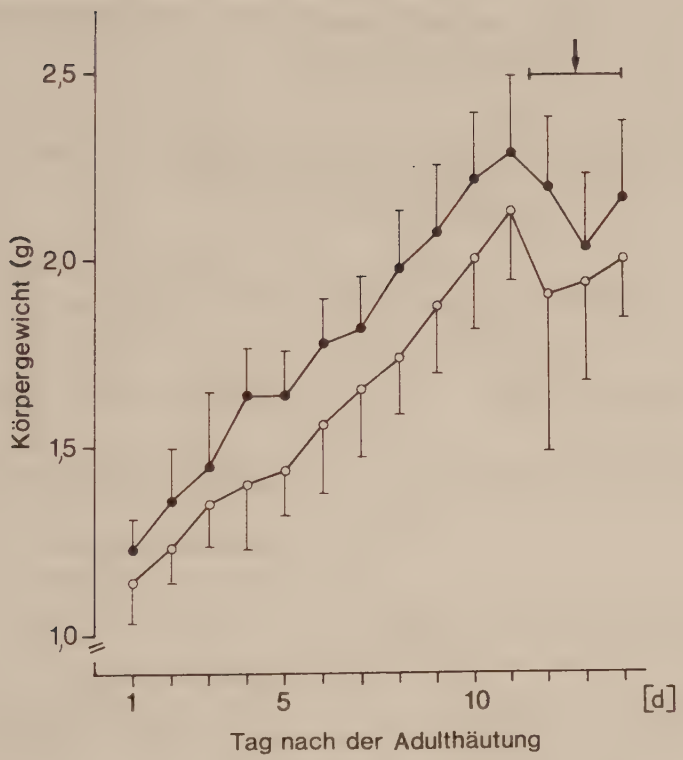


Abb. 8: Gewichtsverlauf adulter Locusta-Weibchen bei täglicher Hämolymphentnahme im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n = 10). ●: unbehandelte Kontrolltiere. O : Tiere, denen ab Tag 1 nach der Adulthäutung täglich 10 µl Hämolymphe entnommen wurde. ⊥: Zeitraum der Eiablage.

3.2.3. Gleichzeitige Bestimmung von Ecdysteroiden und Juvenilhormon in der Hämolymphe

Unter Beibehaltung der Methodik der Juvenilhormonbestimmung (2.6.) lassen sich gleichzeitig auch die Ecdysteroide in der Hämolymphe erfassen. Dafür wurde, nach Ausbeutebestimmungen mit Hilfe von 23,24-^{3}H(N)-Ecdyson, die folgende Methode entwickelt (Abb. 9):

Abb. 9: Schema zur gleichzeitigen Bestimmung von Juvenilhormon (JH III) und Ecdysteroiden (EC) in 10 µl Hämolymphe von Locusta migratoria.

---

10 µl Hämolymphe + interner JH-Standard in 1 ml MeOH
+ 1ml wässrige 2% NaCl

Extraktion mit 3 x 0,5 ml Isooktan

EC in wässriger Phase	JH in organischer Phase
verdünnt auf 10% MeOH	1.Al_2O_3-Filtration
	1.Derivatisierung + 2.Al_2O_3-Filtration
Adsorption an LiChroprep RP-8 (0,5 g)	
	2.Derivatisierung + 3.Al_2O_3-Filtration
äquilibriert: 5 ml Ethylacetat 5 ml MeOH 15 ml 10% MeOH	
	4.Al_2O_3-Filtration
waschen: 2 x 2 ml 10% MeOH	
Elution: 2ml MeOH	5.Al_2O_3-Filtration
RIA	GC-MS-MIS

Die Ausbeute an 20-Hydroxy-Ecdyson wurde ebenfalls bestimmt, da sich dieses Molekül aufgrund seiner höheren Polarität nicht identisch mit Ecdyson verhält.
Für die Ausbeutebestimmung von 20-OH-Ecdyson wurde unmarkiertes Hormon verwendet, dessen Konzentration in den einzelnen Fraktionen mit Hilfe des RIA gemessen wurde. Da im Radioimmunoassay eventuell in der Hämolymphe enthaltene Ecdysteroide erfaßt würden, wurden diese Versuche ausschließlich in Medium ohne Hämolymphzusatz durchgeführt.
Für 20-OH-Ecdyson wurden dieselben Ausbeuten erzielt wie für Ecdyson (Tab. 5).

Tab. 5: Verluste bei der Isolierung von Ecdyson. Zu Beginn der Aufarbeitung (Abb. 9) wurde zu 1 ml Methanol $6{,}47 \times 10^5$ dpm ^{3}H-Ecdyson gegeben.

Reinigungssschritt	Verlust in % der eingesetzten dpm
Extraktion mit Isooktan	0,3 ± 0,5 (n=3)
Entsalzen an LiChroprep RP-8	0,2 ± 0,3 (n=3)

Bei der Extraktion mit Isooktan blieben die Ecdysteroide in der wässrigen Phase. Durch Filtration über LiChroprep RP-8 wurden die Proben entsalzt. Ecdyson und 20-OH-Ecdyson wurden am RP-Material (0,5 g) adsorbiert und beim Waschen mit 10% MeOH nicht ausgewaschen. Bei Methanolkonzentrationen über 35% begann zuerst 20-OH-Ecdyson und dann Ecdyson zu desorbieren. Mit 10 ml 50% Methanol/Wasser wurden beide Ecdysteroide quantitativ eluiert. 2 ml Methanol waren für eine vollständige Elution bereits ausreichend.

Für die Aufarbeitung von Juvenilhormon wurde das beschriebene Verfahren (siehe dazu 2.6.) beibehalten. Ausbeutebestimmungen mit Hilfe von ^{3}H-JH III ergaben einen durchschnittlichen Gesamtverlust von 27,6% (Tab. 6). Die größten Verluste treten bei den beiden Derivatisierungsschritten auf. Da die Verluste den mitgeführten internen Standard in gleichem Maße betreffen, fallen sie bei der Konzentrationsbestimmung von Juvenilhormon in biologischen Proben nicht ins Gewicht.

Tab. 6: Durchschnittliche Verluste bei der Isolierung von ^{3}H-Juvenilhormon III. Zu Beginn der Aufarbeitung wurde den Proben etwa 10 pmol JH III (2,42 x 105 dpm) zugesetzt.

Reinigungsschritt	Verlust an eingesetztem JH III	
	%	pmol
Extraktion mit Isooktan	2,4	0,24
1. Al_2O_3 Filtration	0,1	0,01
1. Derivatisierung mit anschliessender Filtration über Al_2O_3	9,2	0,92
2.Derivatisierung mit anschliessender Filtration über Al_2O_3	11,7	1,17
4. Filtration über Al_2O_3	4,0	0,4
5. Filtration über Al_2O_3	0,2	0,02
Gesamtverlust	27,6	2,76

Auch bei der Aufarbeitung ganzer Tiere ist eine Abtrennung der Ecdysteroide vom Juvenilhormon möglich. Die Ecdysteroide werden beim Waschen mit MeOH/2% wässriger NaCl (1:1) von LiChroprep RP-8 eluiert. Diese Fraktion muß eingeengt werden; nach Aufnehmen in 10% Methanol kann in gleicher Weise wie mit Hämolymphproben verfahren werden.

3.2.4. Juvenilhormonsäure

3.2.4.1. Bestimmung von Juvenilhormonsäure

Es wurde eine Methode entwickelt, um die Juvenilhormonsäure parallel zu Juvenilhormon mit der GC-MS-Technik (2.6.) zu messen. Da die JH-Aufarbeitung unverändert beibehalten werden sollte, wurde zunächst durch Versuche mit radioaktiv markierter JH III-Säure festgestellt, wie sich die Säure vom Hormon trennen läßt.

Für die Ausbeutebestimmungen wurde jeweils frisch hergestellte Säure verwendet, da dieses Molekül bei Lagerung instabil ist. Die Säure wurde Hämolymphproben in Methanol zugesetzt. Beim ersten Schritt der JH-Bestimmung wird das Hormon mit Isooktan aus einer wässrigen Phase (MeOH/2% wässrige NaCl, 1:1) extrahiert. Die JH III-Säure bleibt dabei im wässrigen Medium. Ein Ansäuern der Hämolymphproben mit HCl, um die Säure anschließend mit einem organischen Lösungsmittel zu extrahieren, kommt aus praktischen Gründen für eine routinemäßige Aufarbeitung nicht in Frage. Wie Erfahrungen mit radioaktiv markierter Säure zeigten, entstehen beim Unterschreiten des erforderlichen pH-Werts von 5,0, bei dem die Säure in die organische Phase übergeht, Produkte mit einer höheren Polarität. Diese verbleiben in der wässrigen Phase, bei pH-Werten zwischen 4,0 und 4,5 beträgt ihr Anteil 30 Minuten nach dem Ansäuern bereits bis zu 60% der gesamten eingesetzten Radioaktivität. In saurem Medium wird der 10,11-Epoxy-Ring geöffnet und es entsteht das 10,11-Diol.

Wie bei der Isolierung der Ecdysteroide wurden die Proben deshalb über LiChroprep RP-8 entsalzt (siehe 3.2.) und mit 2 ml Methanol eluiert.

Anschließend wurde die JH-Säure mit Diazomethan zu JH III verestert. Die Proben wurden eingeengt, JH III in Isooktan (1,5 ml) aufgenommem und nach der üblichen Methode bestimmt. Der interne Standard wurde vor dem Verestern zugegeben. Die Gesamtausbeute an Radioaktivität nach dem Verestern betrug durchschnittlich 93% (Tab. 7).

Tab. 7: Verluste bei der Isolierung und Veresterung von radioaktiv markierter JH-III-Säure. Eingesetzt wurden 3 x 10^5 dpm.

Vorgang	Verlust in % der eingesetzten dpm
Extraktion mit Isooktan	1,3 ± 0,3 (n=4)
Entsalzen an LiChroprep RP-8	1,8 ± 0,8 (n=11)
Verestern	4,1 ± 2,5 (n=8)

3.2.4.2. Juvenilhormon III-Säure in biologischen Proben

Für Messungen der JH III-Säure wurden wie für Juvenilhormon 10 µl-Hämolymphproben verwendet. Es wurden insgesamt 59 Proben aus fünf verschiedenen adulten Locusta-Weibchen untersucht. Nur bei einem Tier wurde JH III-Säure in meßbaren Konzentrationen gefunden (zwischen 1 und 7 pmol). In den anderen 49 Proben lag der JH-Säuregehalt unter der Nachweisgrenze oder es konnten nur Spuren nachgewiesen werden. Deshalb wurde von einer routinemäßigen Bestimmung der JH-Säure abgesehen.

3.2.5. Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe adulter *Locusta migratoria*-Weibchen

Für alle Untersuchungen wurden datierte (± 4 h) Weibchen individuell markiert und täglich zur selben Zeit gewogen. Frühestens am Tag 5 wurde ihnen dabei 10 µl Hämolymphe abgenommen. Die Tiere wurden ständig zusammen mit geschlechtsreifen Männchen in gleicher Anzahl gehalten. Da die Eireifung der Weibchen nicht exakt synchron verlief, verteilten sich die Eiablagen innerhalb einer Gruppe auf zwei Tage. Im günstigsten Fall legten 80% der Tiere innerhalb eines Tages. Da sie nicht anhand der Oocytenlänge standardisiert werden konnten (dazu hätte man sie töten müssen), diente der Zeitpunkt der Eiablage als Maß für den Entwicklungszustand. Um diesen möglichst genau eingrenzen zu können, wurden die Weibchen vor der erwarteten Oviposition voneinander getrennt und nur mit Männchen zusammen gehalten. Dreimal täglich wurde kontrolliert, ob eine Eiablage stattgefunden hatte.

Abbildung 10 zeigt den Verlauf von JH III- und Ecdysteroidtitern in der Hämolymphe während des ersten Eireifungszyklus von solchen Tieren, deren Eiablage am Tag 12 nach der Adulthäutung erfolgte. JH III und Ecdysteroide traten im selben Konzentrationsbereich von 10^{-7} M auf. Die Konzentration von JH III stieg nach Tag 5 auf ein Plateau an, erreichte ein Maximum an Tag 11 und fiel vor der Eiablage wieder ab. Der Gehalt an Ecdysteroiden bewegte sich anfangs an der Nachweisgrenze und wies einen deutlichen Peak an Tag 11 auf.

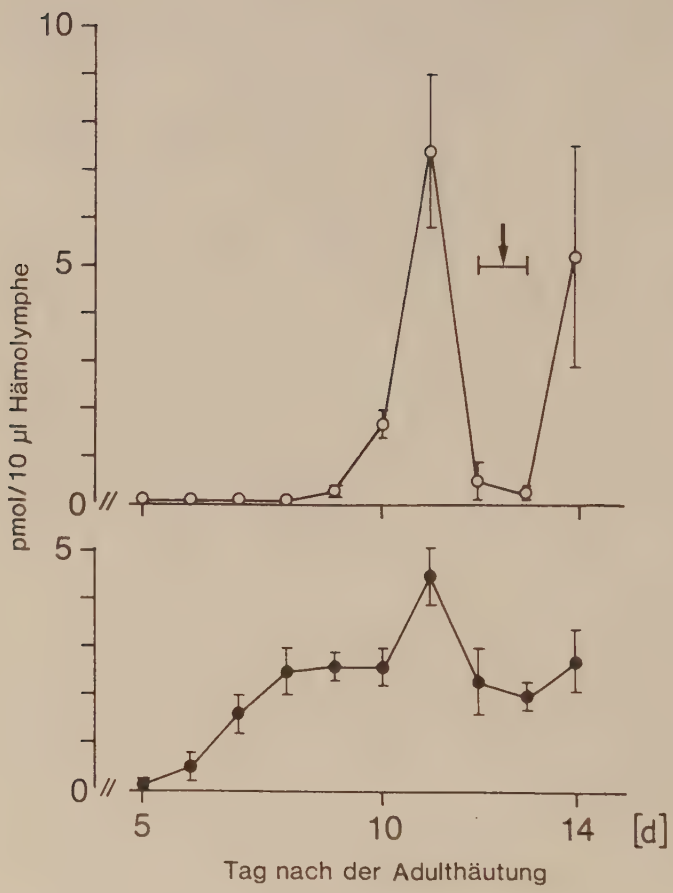


Abb. 10: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe adulter Locusta-Weibchen während des ersten Eireifungszyklus (n = 7). Die Fehlerbalken entsprechen SEM. O : Ecdysonäquivalente. ● : JH III. ⊥: Zeitraum der Eiablagen.

Ein Vergleich mit den Oocytenlängen einer Kontrollgruppe, die unter den selben Bedingungen gehalten worden war, zeigt, daß an Tag 11 die Länge der terminalen Oocyten durchschnittlich 6 ± 0,5 mm betrug (Abb. 11).

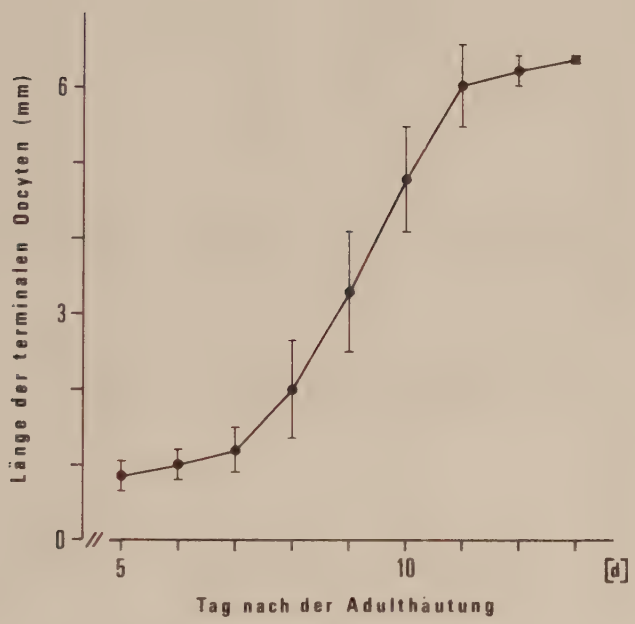


Abb. 11: Länge der terminalen Oocyten aus Locusta-Weibchen im ersten Eireifungszyklus (n = 10 pro Tag). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

In den Abbildungen 12 - 16 sind Beispiele des Titerverlaufs bei Einzeltieren aufgeführt. Bei allen stieg die Ecdysteroidkonzentration in der Hämolymphe bereits an Tag 10 leicht an, gefolgt von Spitzenwerten an Tag 11 und einem Abfall bis zur Nachweisgrenze an Tag 12. Im zweiten Eireifungszyklus wiederholte sich der Ecdysteroidpeak (Abb. 12).

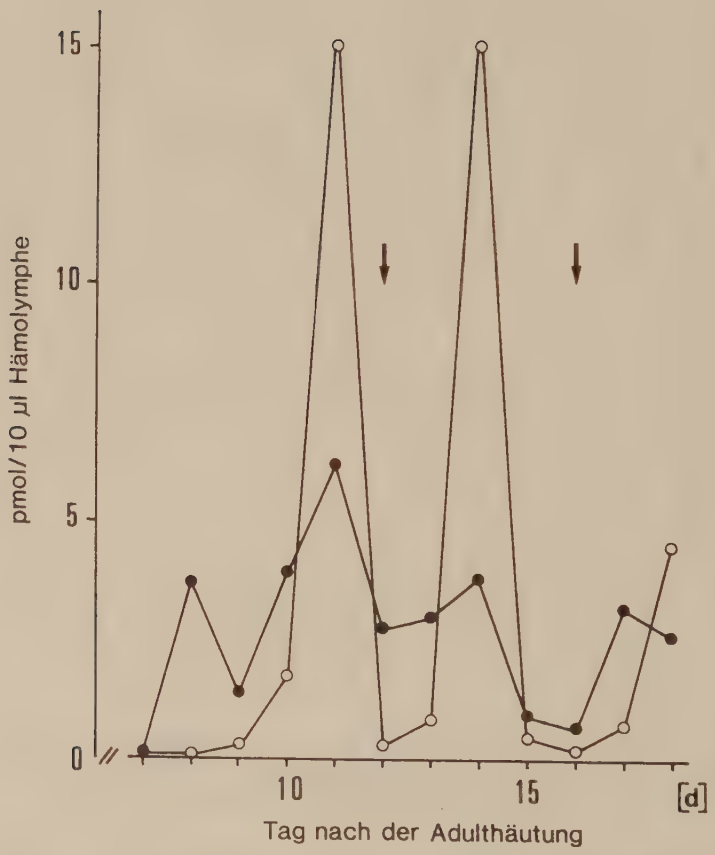


Abb. 12: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines einzelnen Locusta-Weibchens.
●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

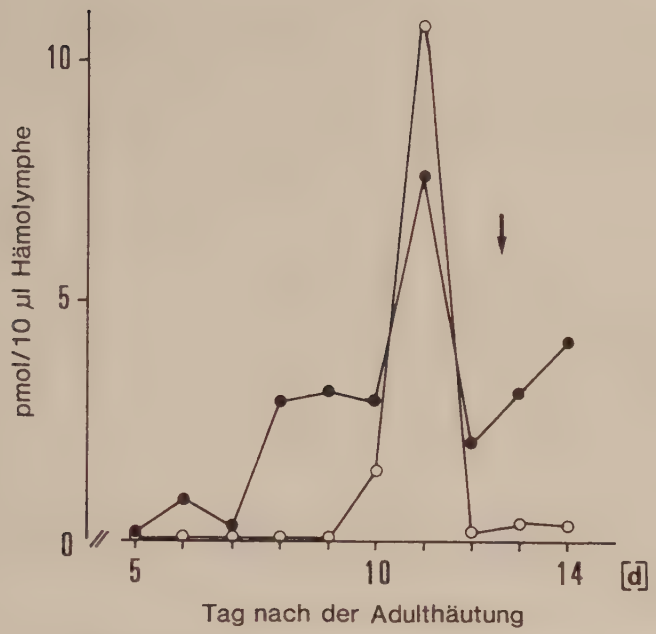


Abb. 13: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines einzelnen Locusta-Weibchens.
●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

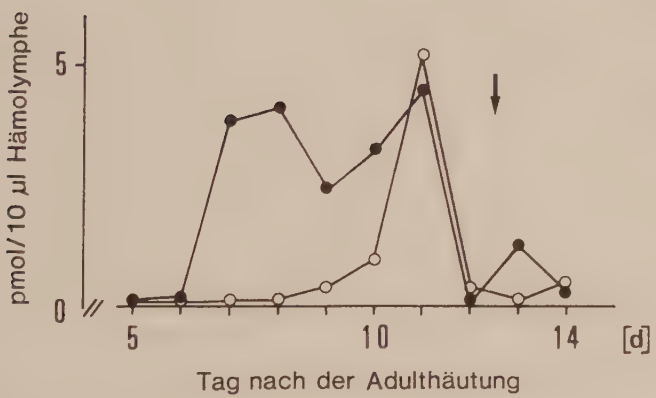


Abb. 14: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines einzelnen Locusta-Weibchens.
●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

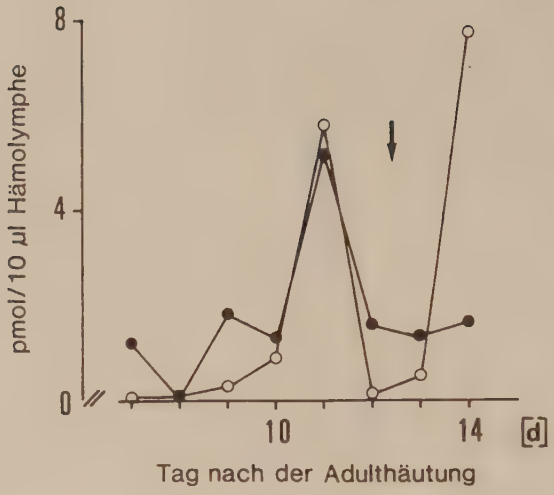


Abb. 15: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines einzelnen Locusta-Weibchens.
●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

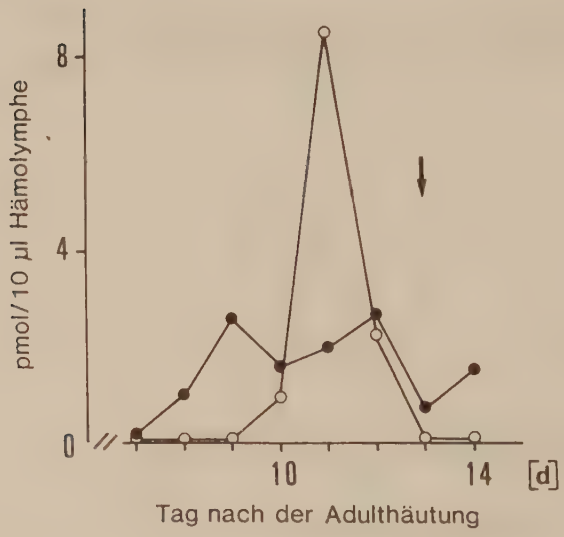


Abb. 16: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines einzelnen Locusta-Weibchens.
●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

Die unterschiedlichen Maximalwerte für die Ecdysteroide bei den einzelnen Tieren lassen vermuten, daß nicht immer das tatsächliche Maximum erfaßt wurde. Dafür spricht auch, daß - wie in Abb. 15 - die Ecdysteroidkonzentrationen im zweiten Eireifungszyklus bedeutend vom ersten abweichen können.

Der Titerverlauf von JH III ist weniger einheitlich. Ein deutlicher Konzentrationsanstieg vor der Eiablage (wie in Abb. 13) war nicht immer nachzuweisen. Der Gehalt an JH III in der Hämolymphe unterlag noch rascheren Schwankungen als der Ecdysteroidtiter. Ein 24 Stunden-Raster reichte nicht aus, um die einzelnen Peaks völlig zu erfassen. Bei Tieren, denen zweimal am Tag Hämolymphe entnommen wurde (Abb. 17), traten starke Konzentrationsänderungen innerhalb von 10 Stunden, bzw. 14 Stunden während der Nacht auf. Bei dem Weibchen in Abb. 17a fiel z.B. der JH III-Gehalt am Tag 8 innerhalb von 12 Stunden von 12 auf 2 pmol/10 µl Hämolymphe.

Hämolymphentnahmen in kürzeren Zeitabständen führten zu Entwicklungsstörungen.

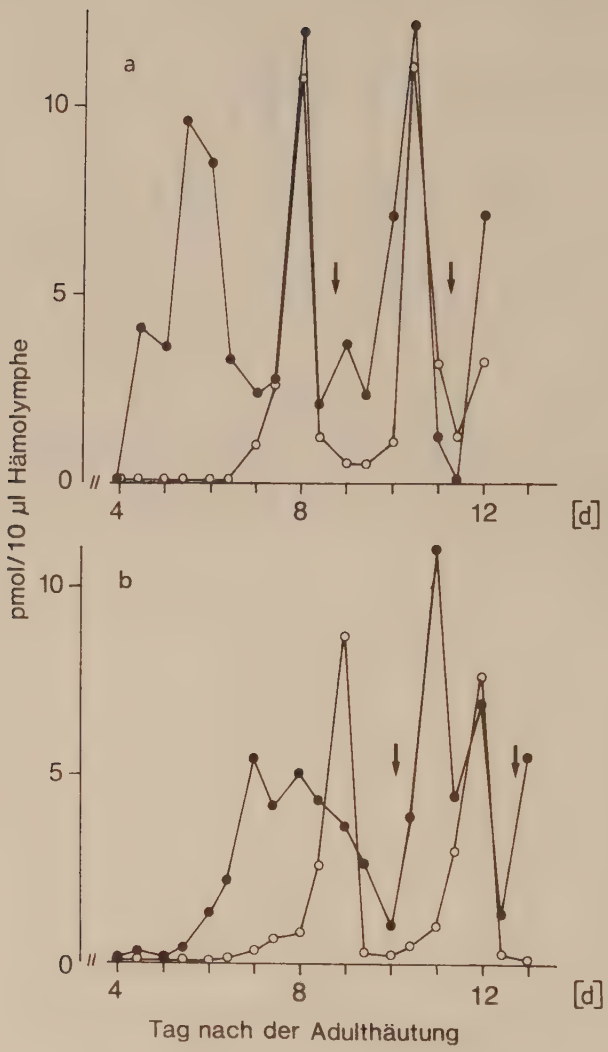


Abb. 17: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe von zwei Locusta-Weibchen (a,b) bei zweimaliger täglicher Hämolymphentnahme in den ersten zwei Eireifungszyklen. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage.

3.2.6. Vitellogenin in der Hämolymphe adulter *Locusta migratoria*-Weibchen

3.2.6.1. Einsetzen der Vitellogenese

Mit Hilfe von SDS-PAGE (2.8.2.) wurde untersucht, ab welchem Zeitpunkt Vitellogenin gebildet und in die Hämolymphe abgegeben wird. Bei der Denaturierung der Hämolymphproteine durch SDS entstehen fünf Untereinheiten von Vitellogenin (Gellissen et al., 1976), die ein charakteristisches Bandenmuster bei der Elektrophorese ergeben (Abb. 18) Es handelt sich dabei um drei Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 97 und 116 KD und zwei Proteine zwischen 45 und 66 KD. Eine der beiden auffälligen Banden bei etwa 85 KD stellt Lipophorin dar (Gellissen und Wyatt, 1981), welches neben Vitellogenin ein wesentlicher Bestandteil der Hämolymphproteine ist.

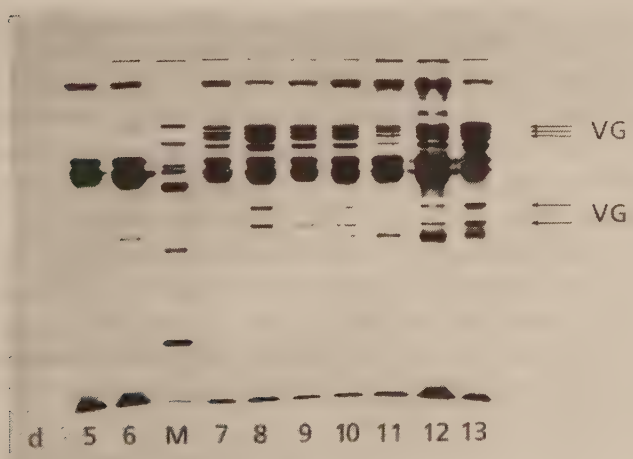


Abb. 18: SDS-Disk-PAGE von Hämolymphproteinen eines adulten *Locusta*-Weibchens. Die Zahlen geben den Tag nach der Adulthäutung an. M = Molekulargewichts-Marker (205; 116; 97,4; 66; 45; 29 KD). VG = Vitellogeninbanden.

Einer Gruppe von 10 datierten Weibchen wurde ab Tag 5 nach der Adulthäutung täglich 10 µl Hämolymphe entnommen. Der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt und Aliquote von 20 µg Protein für die Elektrophorese eingesetzt.

Bei vier der untersuchten Tiere waren bereits an Tag 6 schwache Banden von Vitellogenin erkennbar (wie in Abb. 18), ab Tag 7 wurde Vitellogenin bei allen Weibchen nachgewiesen. Die Dauer des ersten Eireifungszyklus betrug 12 - 13 Tage.

3.2.6.2. Vitellogeninkonzentration in der Hämolymphe

Die quantitative Bestimmung von Vitellogenin in der Hämolymphe wurde mit Rocket-Immunelektrophorese durchgeführt. Die untersuchten Tiere (n = 8) wiesen eine einheitliche Entwicklung auf; sechs Weibchen legten ihre Eier am Nachmittag von Tag 12, die restlichen beiden am Vormittag von Tag 13. Auch dieser Gruppe wurde ab Tag 5 täglich 10 µl Hämolymphe entnommen und der Gesamtproteingehalt bestimmt.

Der Titerverlauf von Vitellogenin war bei allen Tieren identisch (Abb. 19). An Tag 5 nach der Adulthäutung war noch kein Vitellogenin nachzuweisen, an Tag 6 geringe Mengen, danach nahm die Konzentration stark zu. Die höchsten Werte waren an Tag 9 und 10 zu finden. Anschließend setzte der massive Einbau von Vitellogenin in die schnell wachsenden Oocyten ein und das Protein verschwand zunehmend aus der Hämolymphe. Das Körpergewicht der Tiere nahm währenddessen noch weiter zu (Abb. 20). Nach der Eiablage stiegen die Vitellogeninkonzentrationen im zweiten Eireifungszyklus erneut an.

Der Verlauf des Gesamtproteintiters war stark geprägt von der Vitellogeninkonzentration. Die Kurven verlaufen nahezu parallel (Abb. 21). Zu Zeiten der höchsten Konzentration macht Vitellogenin fast ein Drittel aller Hämolymproteine aus.

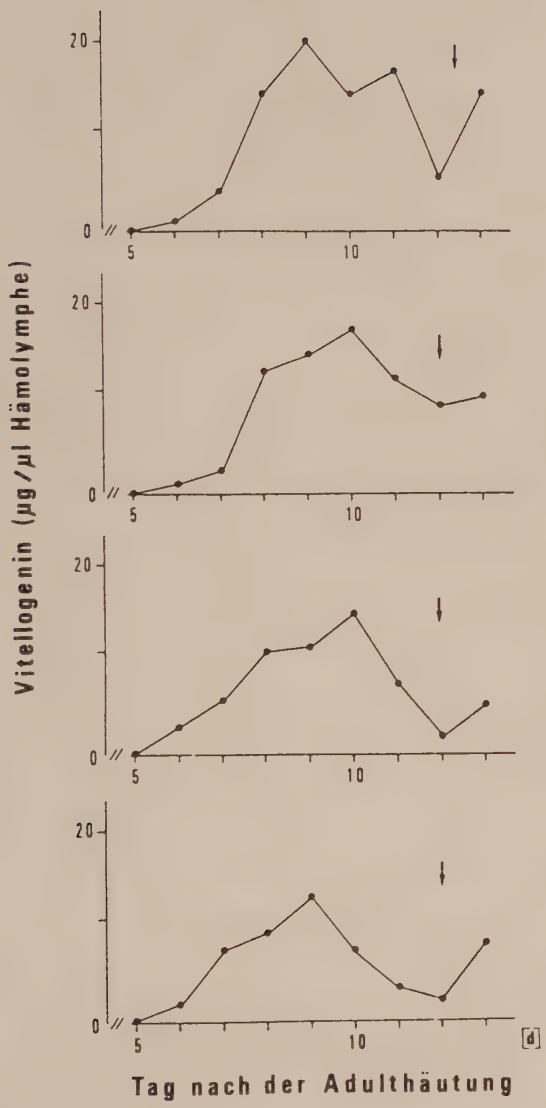


Abb. 19: Vitellogenintiter in der Hämolymphe einzelner <u>Locusta</u>-Weibchen. ↓: Eiablage.

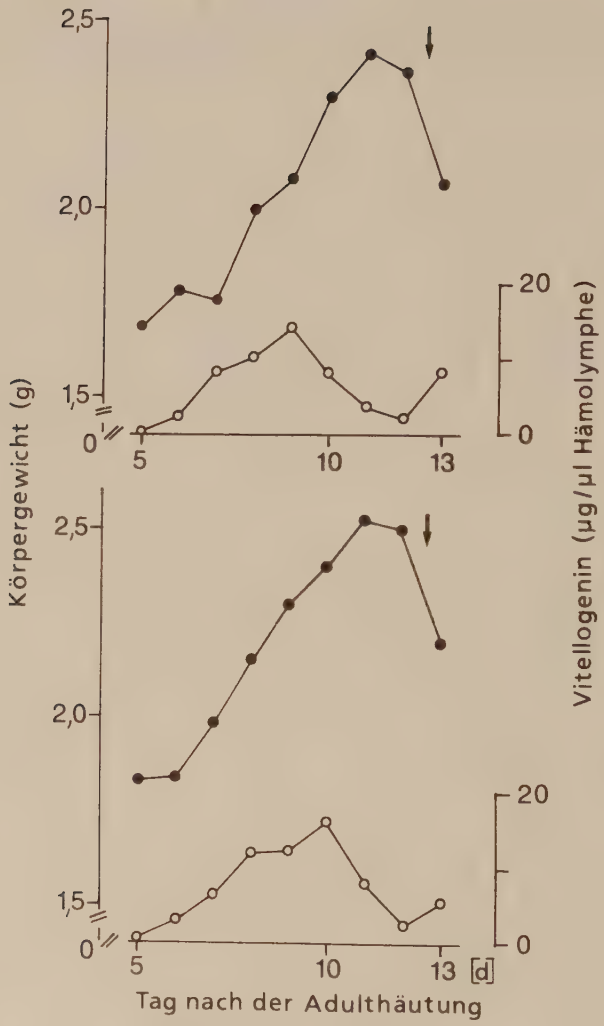


Abb. 20: Vitellogenintiter (O) in der Hämolymphe und Körpergewicht (●) einzelner Locusta-Weibchen. ↓: Eiablage

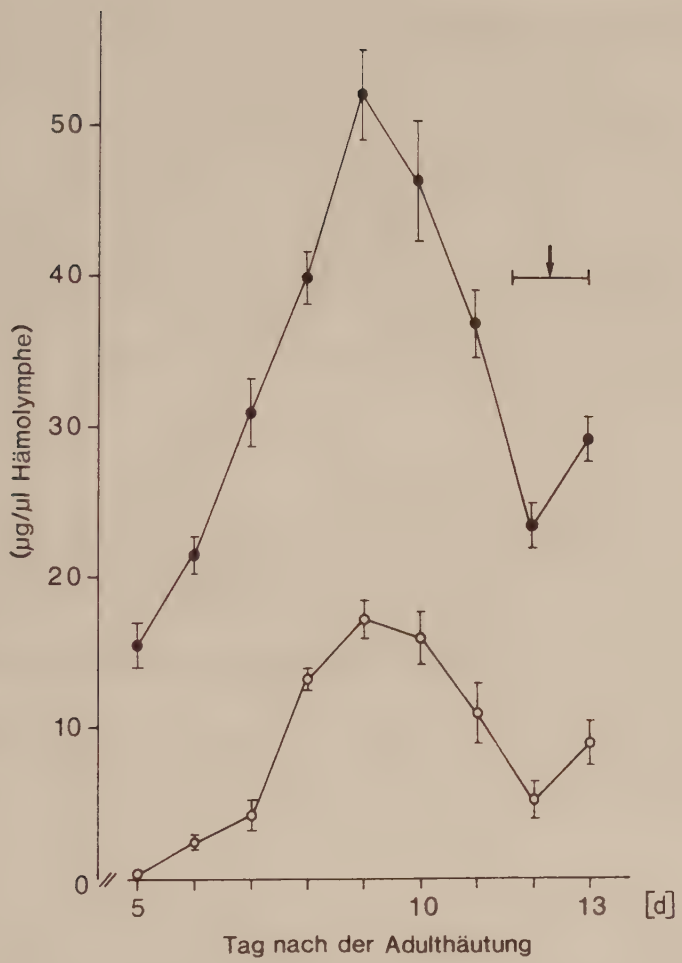


Abb. 21: Vitellogenin (O) und Gesamtprotein (●) in der Hämolymphe adulter Locusta-Weibchen (n = 9). Die Fehlerbalken sind als SEM angegeben. ⊥: Zeitraum der Eiablagen.

3.3. Wirkung von Azadirachtin auf die Entwicklung adulter *Locusta migratoria*-Weibchen

Um den Einfluß auf den Juvenilhormontiter und die damit eng verbundene Vitellogenese zu untersuchen, wurde das Azadirachtin während der Prävitellogenese, kurz vor dem Anstieg des Juvenilhormontiters in der Hämolymphe, injiziert.

Verschiedene Azadirachtindosen (0,5 - 5 µg pro Gramm Körpergewicht) wurden adulten Weibchen vier Tage nach der letzten Häutung injiziert. Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge 16% Ethanol. Die Tiere wurden täglich gewogen und die Sterblichkeitsrate bestimmt. Eigelege wurden abgesammelt. Nach 20 Tagen wurden die überlebenden Weibchen getötet und wie bei den verstorbenen Versuchstieren der Zustand der Ovarien untersucht.

3.3.1. Einfluß auf die Mortalität

Mit steigender Azadirachtindosis nahm die Sterblichkeit der Tiere innerhalb des ersten Eireifungszyklus der Kontrollen (Eiablage: Tag 12 bis 14) zu. Bei Dosen ab 3,5 µg/g betrug die Mortalität 100% (Abb. 22).

Unabhängig von der Dosis lagen zwischen der Injektion und dem Tod der Tiere stets mehr als zwei Tage.

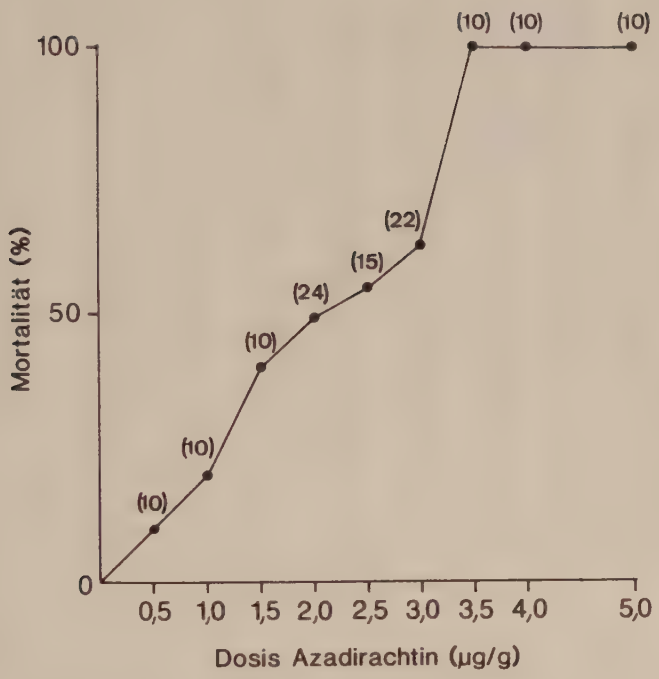


Abb. 22: Mortalität adulter Locusta-Weibchen nach Injektion verschiedener Azadirachtinkonzentrationen an Tag 4 nach der Adulthäutung. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Tiere pro Dosis an.

3.3.2. Einfluß auf den Gewichtsverlauf

Azadirachtin beinflußte den Gewichtsverlauf der Tiere. Während das Gewicht der Kontrollen - bedingt durch die Eireifung - von Tag 4 bis zu Tag 12 um mehr als 60% zunehmen konnte (durchschnittlich 53%), war die Gewichtssteigerung bei niedrigen Azadirachtindosen reduziert; bei Dosen über 2,5 µg/g traten Gewichtsverluste auf (Abb. 23).

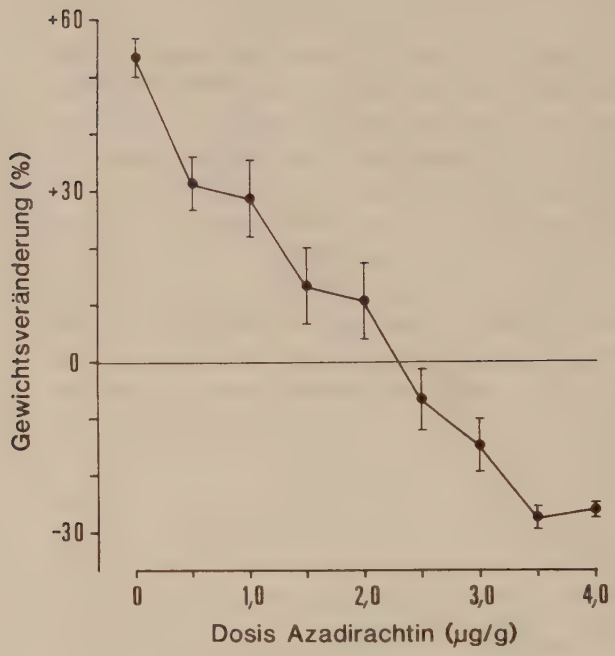


Abb. 23: Gewichtsveränderung adulter Locusta-Weibchen innerhalb von acht Tagen nach Injektion verschiedener Azadirachtinkonzentrationen an Tag 4 nach der Adulthäutung. Die Fehlerbalken sind als SEM angegeben (n = 10).

3.3.3. Einfluß auf die Eientwicklung

Mit steigender Azadirachtindosis wurde eine normale Eireifung verhindert. Bereits nach Injektion von 0,5 µg/g hatten nur noch 50% der Weibchen eine den Kontrollen entsprechende Eientwicklung. Der Anteil solcher Tiere sank mit höheren Konzentrationen, ab 2,5 µg/g wurde eine normale Entwicklung völlig unterbunden (Abb. 24).

Bis zur Dosis von 3 µg/g war die Reaktion der Versuchstiere innerhalb einer Gruppe unterschiedlich.

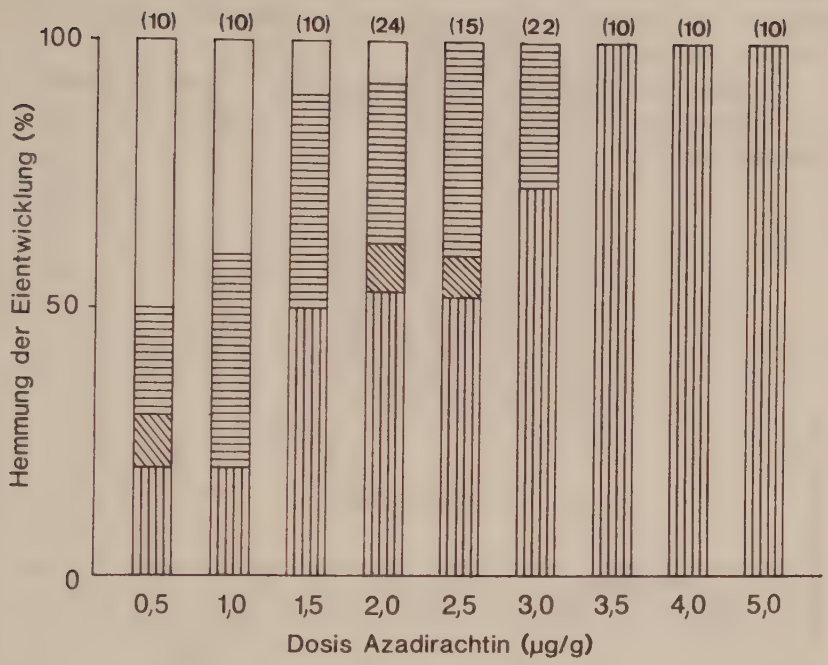


Abb. 24: Hemmung der Eientwicklung adulter Locusta-Weibchen nach Injektion verschiedener Azadirachtinkonzentrationen an Tag 4 nach der Adulthäutung. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Dosis ist in Klammern angegeben. ▭: normale Eientwicklung. ▤: verspätete Eientwicklung. ▧: fehlerhafte Eientwicklung. ▥: fehlende Eientwicklung.

Bei allen untersuchten Konzentrationen traten Weibchen auf, die nach starkem Gewichtsverlust starben, in der Regel innerhalb des ersten Ovipositionszyklus der Kontrollen. Diese Tiere wiesen zum Zeitpunkt des Todes keinerlei Anzeichen von Oogenese auf, die Ovarien waren klein und unentwickelt.

Neben den Weibchen mit normaler Eiablage gab es Tiere, die eine gegenüber den Kontrollen deutlich verspätete Eiablage hatten. Ihre Gelege waren etwas kleiner, aber die Larven schlüpften und entwickelten sich normal.

Ein kleiner Prozentsatz der Versuchstiere paßte in keine der beschriebenen Gruppen. Diese Weibchen starben ohne Ei-

ablage, enthielten aber unterschiedlich entwickelte Oocyten. Einige wiesen Eier auf, andere hatten blaßgraue Oocyten in geringer Anzahl.

Weibchen mit normaler, verspäteter oder völlig inhibierter Eientwicklung zeigten jeweils einen typischen Gewichtsverlauf (Abb. 25).

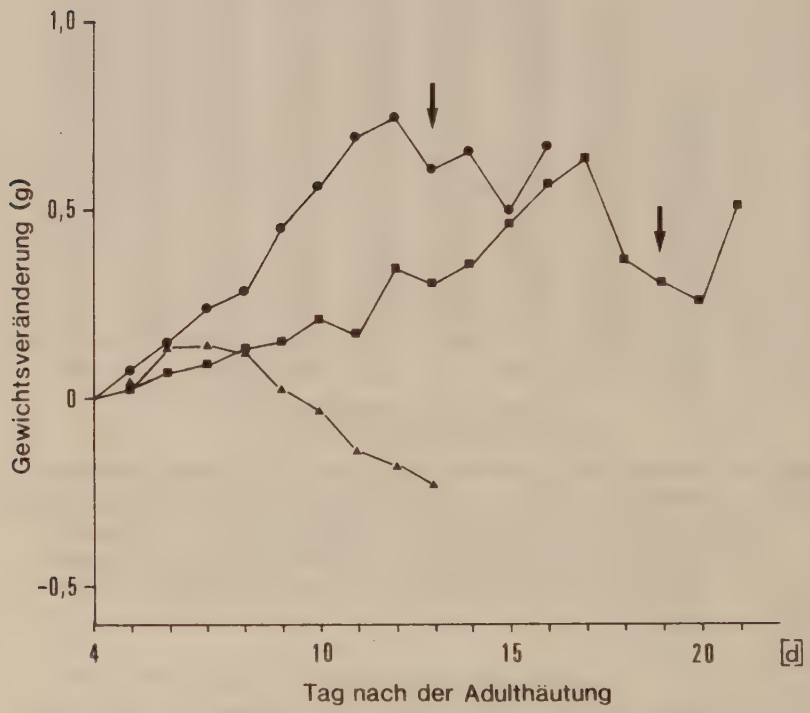


Abb. 25: Gewichtsverlauf adulter Locusta-Weibchen mit verzögerter oder inhibierter Oogenese nach Injektion von 2 µg Azadirachtin/g Körpergewicht an Tag 4 nach der Adulthäutung. Standardabweichungen (maximal ± 0,2) wurden der Übersichtlichkeit halber nicht eingetragen. ●: Kontrollen (n=3). ■: Weibchen mit verzögerter Oogenese (n=3). ▲: Weibchen mit inhibierter Oogenese (n=3). ↓: Eiablagen.

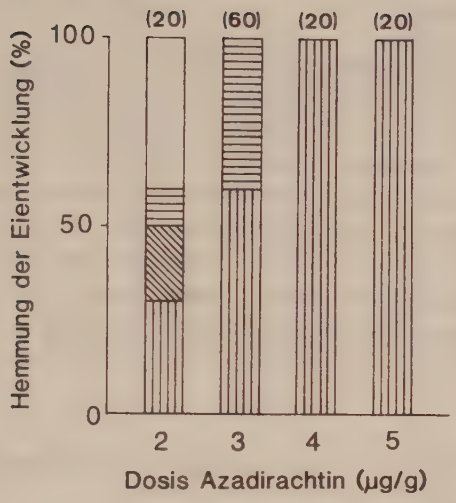


Abb. 26: Hemmung der Eientwicklung adulter Locusta-Weibchen nach Injektion verschiedener Azadirachtinkonzentrationen an Tag 3 nach der Adulthäutung. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Dosis ist in Klammern angegeben. ▭ : normale Eientwicklung. ▤ : verspätete Eientwicklung. ▧ : fehlerhafte Eientwicklung. ▥ : fehlende Eientwicklung.

Die selben individuellen Reaktionen traten auf, wenn Azadirachtin bereits an Tag 3 nach der Adulthäutung injiziert wurde, jedoch war die prozentuale Verteilung anders (Abb. 26).

Bei 2 µg/g kamen noch 40% der Tiere zur normalen Eiablage, bei 3 µg/g war der Anteil der verspäteten Eiablagen höher. Ab 4 µg/g fand wiederum keine Eientwicklung statt, obwohl 18% der Tiere länger als 20 Tage überlebten. Im Bereich der niedrigeren Dosen war die Mortalität nur unwesentlich geringer, als nach Injektion an Tag 4.

Der Effekt von Azadirachtin schien jedoch deutlich schwächer, wenn die Tiere am ersten Tag nach der Adulthäutung behandelt wurden. Bei der untersuchten Konzentration von 3 µg/g fanden im Gegensatz zu späteren Injektionen noch 50% normale Eiablagen statt und die Mortalität innerhalb von 15 Tagen betrug nur 20%.

3.3.4. Wirkung von Azadirachtin auf die Hormontiter in der Hämolymphe

Für die Untersuchung der Hormontiter wurde eine Azadirachtindosis von 3 µg/g an Tag drei nach der Adulthäutung eingesetzt. Bei dieser Konzentration war der Effekt auf die Eientwicklung am einheitlichsten; normale Eiablagen fanden nicht mehr statt. Eine Versuchsgruppe teilte sich in Weibchen ohne jegliche Eientwicklung und solche mit verspäteter Eiablage. Alle Tiere wurden ab Tag fünf, spätestens ab Tag 7, täglich gewogen. Anschließend wurde ihnen 10 µl Hämolymphe entnommen. Auf Eiablage wurde 3 x täglich kontrolliert. Hormonbestimmungen wurden stets in Einzeltierproben durchgeführt.

3.3.4.1. Hormontiter in der Hämolymphe von Weibchen ohne Oogenese

In der Hämolymphe von Weibchen ohne Eientwicklung war Juvenilhormon nur in geringen Mengen vorhanden (Abb. 27). Häufig lagen die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze. Ecdysteroide wurden nicht gefunden.

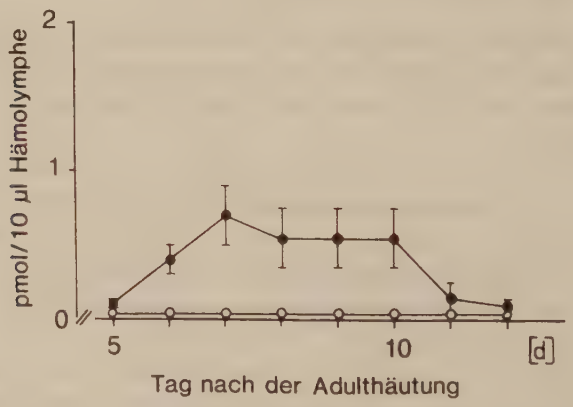


Abb. 27: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe von adulten Locusta-Weibchen ohne Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. Fehlerbalken sind als SEM angegeben (n = 15). ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente.

Beispiele für den Titerverlauf in einzelnen Tieren sind in Abbildung 28 aufgeführt. Tiere ohne Eireifung überlebten nur selten länger als 16 Tage. Eine Ausnahme stellt das Weibchen aus Abbildung 29 dar. Sein JH III-Titer betrug stets weniger als 2 pmol/10 µl Hämolymphe, Ecdysteroide wurden nicht nachgewiesen.

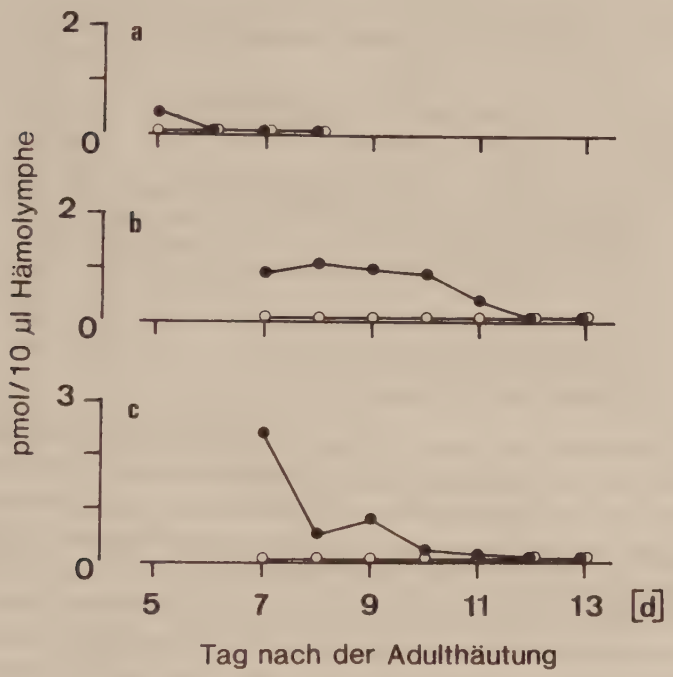


Abb. 28: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe einzelner adulter Locusta-Weibchen ohne Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. Die Tiere starben an Tag 9 (a), bzw. an Tag 14 (b,c). ●: JH III. o: Ecdysonäquivalente.

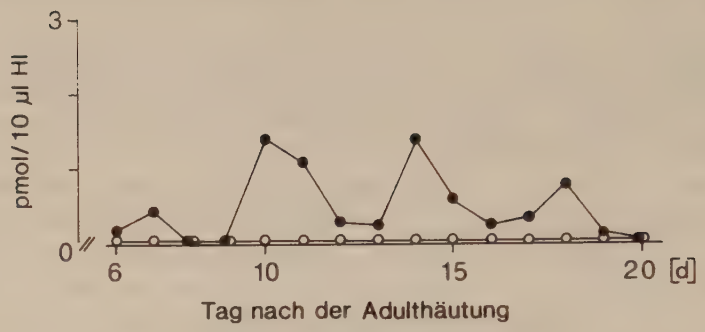


Abb. 29: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens ohne Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente.

3.3.4.2. Hormontiter in der Hämolymphe von Weibchen mit verspäteter Eiablage

Bei Weibchen mit einer verspäteten Eiablage stieg, wie bei den Kontrolltieren, die Hormonkonzentration in der Hämolymphe an. Entsprechend dem Zeitpunkt der Oviposition waren die Maximalwerte von Juvenilhormon und Ecdysteroiden zeitlich verschoben (Abb. 30 - 34). Vor Tag 10 waren die JH III-Titer niedrig, danach wurden Werte im selben Konzentrationsbereich wie bei den Kontrollen gemessen. Ecdysteroide wurden wiederum nur als Peaks vor den Eiablagen nachgewiesen und nur im normalen Konzentrationsbereich der Kontrollen.

Für beide Hormone waren die Spitzenwerte einzelner Tiere unterschiedlich (Ecdysteroide: 3 - 15 pmol/10 µl Hämolymphe). Daß diese Abweichungen vermutlich auf dem groben Zeitraster der Hämolymphentnahme beruhen, zeigt Abbildung 34. Bei diesem Weibchen wurde der zweite Eireifungszyklus mit erfaßt und dort war der Ecdysteroidwert doppelt so hoch wie im ersten Zyklus.

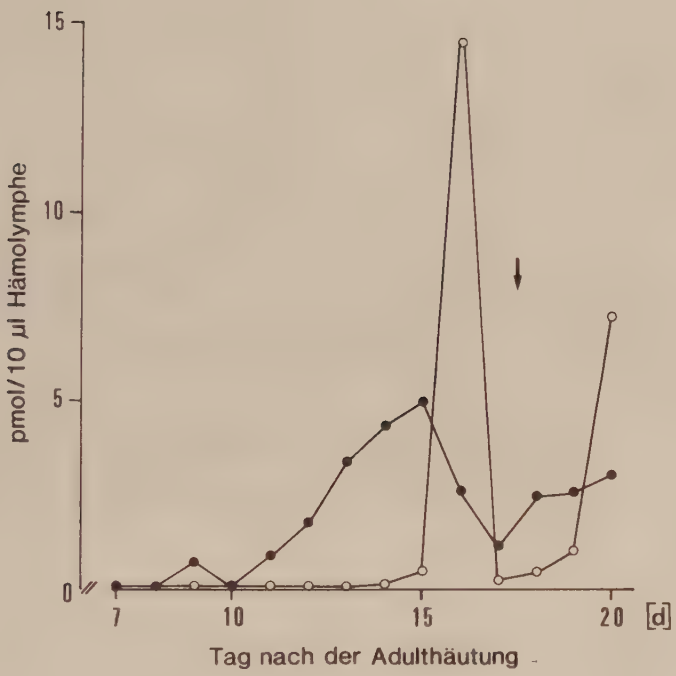


Abb. 30: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens mit verspäteter Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. O: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage

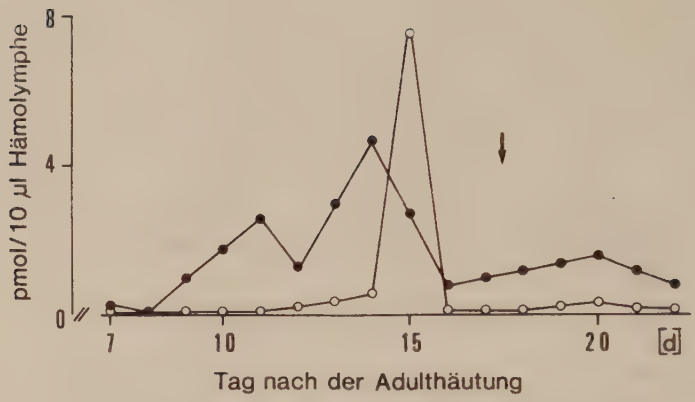


Abb. 31: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens mit verspäteter Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage

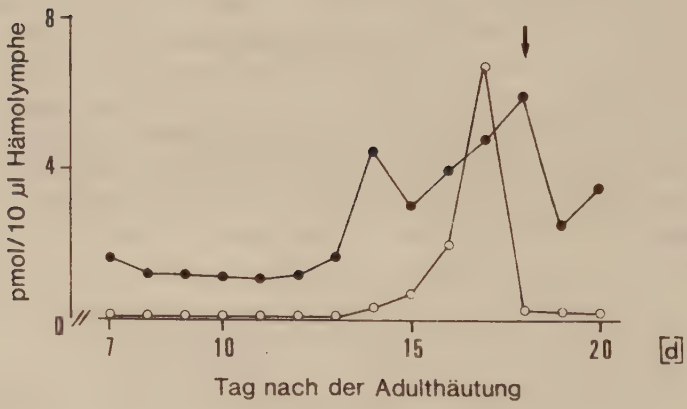


Abb. 32: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens mit verspäteter Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage

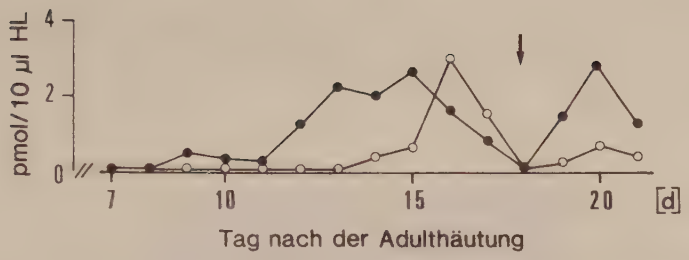


Abb. 33: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens mit verspäteter Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage

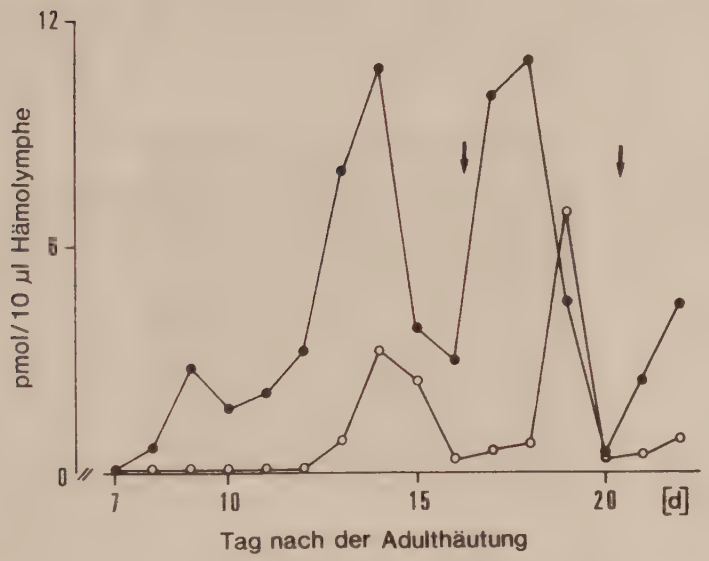


Abb. 34: Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe eines adulten Locusta-Weibchens mit verspäteter Eientwicklung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ●: JH III. ○: Ecdysonäquivalente. ↓: Eiablage

3.3.5. Wirkung von Azadirachtin auf die Vitellogenese

Ergänzend zur Bestimmung der Hormontiter wurde die Vitellogenese nach Azadirachtinbehandlung untersucht. Für die Versuche galten die selben Bedingungen, die unter 3.3.4. beschrieben sind.

3.3.5.1. Vitellogenin in der Hämolymphe von Weibchen ohne Eientwicklung

Die Hämolymphe von Weibchen, deren Oogenese nach Injektion von 3 µg Azadirachtin/g Körpergewicht an Tag 3 völlig inhibiert war, enthielt kein Vitellogenin. Dies ergaben die Analysen mit SDS-Elektrophorese (Proben von 15 Tieren) und Rocket-Immunelektrophorese (Proben von 7 weiteren Tieren).

Der Gesamtproteingehalt in der Hämolymphe der Weibchen war gegenüber den Kontrollen deutlich erniedrigt (Tab. 8).

Tab. 8 : Gesamtproteingehalt der Hämolymphe nach Injektion von 3 µg Azadirachtin/g Körpergewicht an Tag 3 nach der Adulthäutung.

Tag nach der Adulthäutung	µg Protein/ µl Hämolymphe 3 µg Aza/g (n=15)	Kontrollen (n=9)
5	8,1 ± 2,0	17,9 ± 3,4
6	12,5 ± 2,4	21,6 ± 3,7
7	10,6 ± 1,9	31,1 ± 6,1
8	11,1 ± 2,3	37,6 ± 4,9
9	9,8 ± 2,1	52,3 ± 8,8
10	10,5 ± 2,8	46,4 ± 11,1
11	8,4 ± 1,9	36,9 ± 6,0
12	8,2 ± 1,7	23,4 ± 4,2
13	7,9 ± 2,0	29,3 ± 4,2

3.3.5.2. Vitellogenin in der Hämolymphe von Weibchen mit verspäteter Eiablage

Die Hämolymphproteine von Weibchen mit verspäteter Eiablage wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. (Beispiele in Abb. 35)

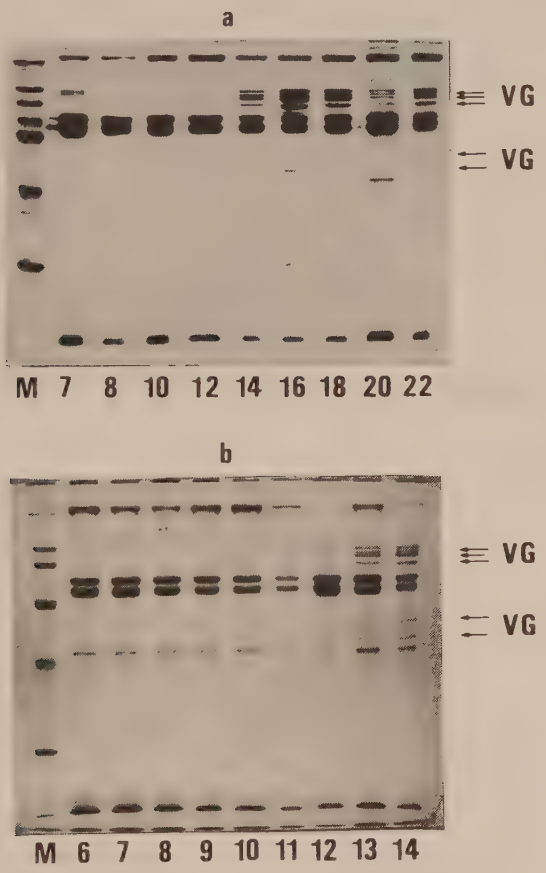


Abb. 35: SDS-Disk-PAGE von Hämolymphproteinen aus zwei *Locusta*-Weibchen (a,b) mit verspäteter Eiablage nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. Die Zahlen geben den Tag nach der Adulthäutung an. M = Molekulargewichts-Marker (205; 116; 97,4; 66; 45; 29 KD). VG = Vitellogeninbanden.

Bei zwei von neun untersuchten Weibchen wurden bereits an Tag 7 schwache Vitellogeninbanden gefunden, die jedoch bis Tag 14 wieder fehlten (Abb. 35a). Ansonsten war Vitellogenin nicht vor Tag 10 in der Hämolymphe nachweisbar (Abb. 35b). Mit Hilfe von Rocket-Immunelektrophoresen wurden die Vitellogeninkonzentrationen in der Hämolymphe einzelner Weibchen ermittelt (Abb. 36).

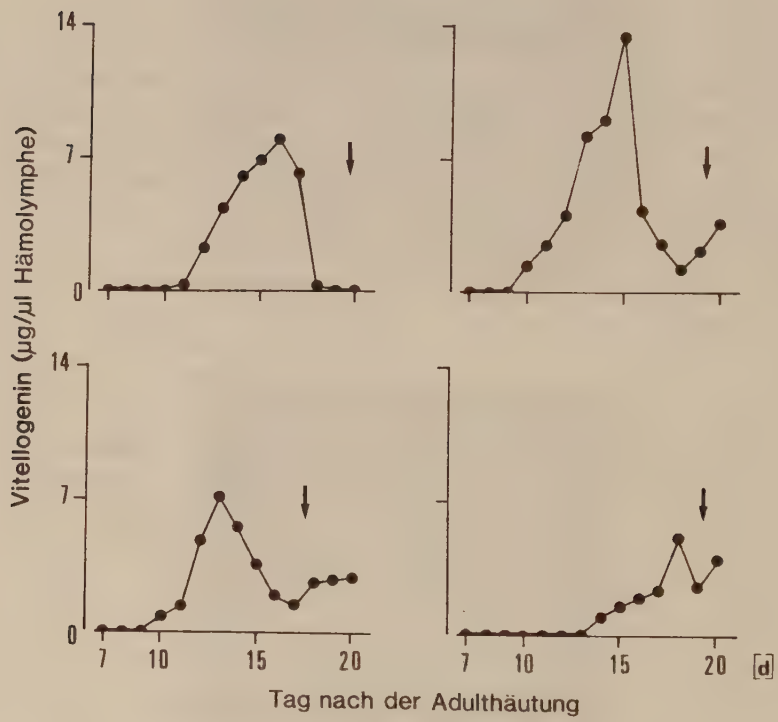


Abb. 36: Vitellogenintiter in der Hämolymphe einzelner *Locusta*-Weibchen mit verspäteter Eiablage nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. ↓ : Eiablage.

Die Vitellogenintiter waren niedriger als bei unbehandelten Weibchen. Die jeweils höchsten Konzentrationen betrugen 9,9 ± 2,1 µg/µl gegenüber 17,7 ± 3,3 µg/µl Hämolymphe .

Gleichzeitig war auch der Gesamtproteingehalt der Hämolymphe deutlich erniedrigt. Die höchsten gemessenen Werte lagen bei 25,5 ± 4,9 µg/µl gegenüber 54,8 ± 7,5 µg/µl bei Kontrolltieren. Abbildung 37 zeigt im Vergleich den Vitellogenin- und Gesamtproteingehalt der Hämolymphe eines unbehandelten Weibchens und eines Weibchens mit verzögerter Eiablage nach Injektion von Azadirachtin.

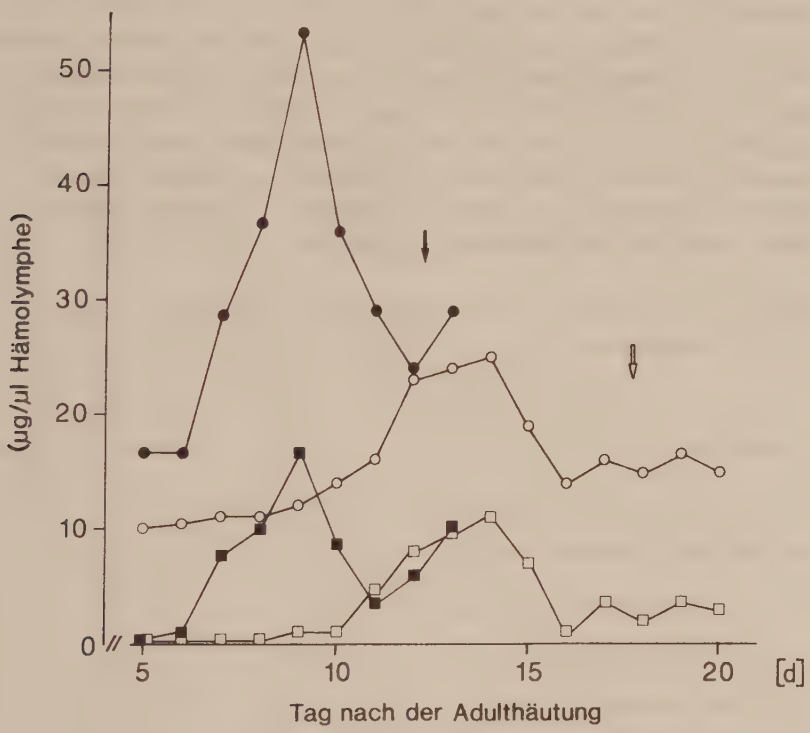


Abb. 37: Vitellogenin (□) und Gesamtprotein (O) in der Hämolymphe von Locusta-Weibchen. Schwarze Symbole: unbehandeltes Kontrolltier. Weiße Symbole: Weibchen mit verspäteter Eiablage nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g Körpergewicht) an Tag 3 nach der Adulthäutung. Eiablage: ↓ Kontrolle; ⇓ Azad.-Inj.

3.4. Wirkung von Hydropren auf mit Azadirachtin behandelte *Locusta migratoria*-Weibchen

Um festzustellen, ob die Wirkung von Azadirachtin durch Juvenilhormon aufgehoben werden kann, wurden Weibchen nach der Injektion von Azadirachtin mit Hydropren, einem JH-Analog behandelt.

Adulten Weibchen wurde an Tag 3 nach der Adulthäutung 3 µg Azadirachtin pro Gramm Körpergewicht injiziert. Einem Teil der Tiere wurde an Tag 5 Hydropren in einer Dosis von 5 µg pro Tier gespritzt. Die Weibchen einer zweiten Versuchsgruppe wurden ab Tag 5 täglich mit 100 pmol Hydropren behandelt. Kontrollen wurde jeweils 50% Ethanol injiziert.

Nur der Effekt auf die Mortalität wurde untersucht. Unter den beschriebenen Bedingungen konnte weder mit der einmaligen hohen Dosis von 5 µg Hydropren, noch mit der physiologischen Dosis von 100 pmol täglich eine deutliche Änderung gegenüber nur mit Azadirachtin behandelten Tieren erzielt werden. In Tabelle 9 ist die Mortalität innerhalb von 15 Tagen nach der Adulthäutung angegeben.

Tab. 9: Mortalität nach Behandlung mit Azadirachtin und Hydropren

Behandlung	n	Mortalität (%)
Kontrollen, Lösungsmittel an d5	10	0
Lösungsmittel täglich	10	20
3 µg Azadirachtin/g an d3	20	65
3 µg Azadirachtin/g an d3 + 5 µg Hydropren an d5	20	60
3 µg Azadirachtin/g an d3 + 100 pmol Hydropren täglich ab d5	20	80

Die höhere Mortalität nach täglicher Injektion von Hydropren ist auf Schädigungen der Tiere durch die Injektionen zurückzuführen, wie der Prozentsatz der Sterblichkeit bei den entsprechenden Kontrollen zeigt. Bei keinem der Versuchstiere, die starben, war eine Eientwicklung festzustellen.

4. Diskussion

4.1. Juvenilhormontiter in Larven von Locusta migratoria

Die Hämolymphe von Locusta migratoria-Larven enthält im vierten Stadium nur geringe Juvenilhormon III-Mengen (weniger als 2 pmol/100 µl), im fünften Stadium sinkt der Titer sogar unter die Nachweisgrenze. Ein ähnlicher Verlauf, mit einem Maximum zur Mitte des vorletzten Stadiums, wurde von Johnson und Hill (1973) mit dem nicht quantitativen Galleria-Bioassay festgestellt; allerdings finden die Autoren einen Anstieg des Hormontiters kurz vor der Adulthäutung. Von Bergot et al. (1981b) und Huibregtse-Minderhoud et al. (1980) wurden mit GC-MS- bzw. GC-ECD-Technik nur jeweils am zweiten Tag der beiden Larvalstadien JH III-Konzentrationen gemessen, die aber mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut übereinstimmen. Baehr et al. (1979) fanden mit einem RIA hohe JH I-Konzentrationen. Dies wird durch die erwähnten Daten aus physiko-chemischen Messungen nicht bestätigt, mit denen stets nur JH III nachgewiesen wurde. Die Diskrepanz ist vermutlich auf die unspezifische Kreuzreaktion des Antiserums mit Lipiden zurückzuführen (de Kort und Granger, 1981). Wie auch bei Locusta, wurde mit Ausnahme der Lepidopteren in allen bisher untersuchten Insektenspezies nur Juvenilhormon III gefunden (siehe dazu Schooley et al., 1984 und Rembold und Lackner, 1985).

Der Juvenilhormontiter bei Locusta migratoria-Larven entspricht dem klassischen Schema der hormonellen Regulation der Metamorphose (Wigglesworth, 1966), wonach die Natur einer Häutung durch die Juvenilhormonkonzentration in der Hämolymphe geprägt wird. Vor der Adulthäutung ist Juvenilhormon nicht oder nur in geringsten Mengen vorhanden. Dies wurde auch bei anderen Hemimetabolen wie Teleogryllus commodus (Loher et al., 1983), Diploptera punctata (Tobe et al., 1985) oder Nauphoeta cinerea (Lanzrein et al., 1985) festgestellt.

In holometabolen Insekten sinkt der Juvenilhormontiter zum Ende des letzten Larvenstadium ebenfalls auf ein sehr niedriges Niveau (z. B. Galleria mellonella: Sehnal und

Rembold, 1985; Drosophila hydei: Bührlen et al., 1984; Drosophila melanogaster: Sliter et al., 1987; Bownes und Rembold, 1987). Bei einigen Lepidopteren wie Manduca sexta (Riddiford und Truman, 1978) und Pieris brassicae (Mauchamp et al., 1979) und auch bei Apis mellifica (Rembold, 1986) tritt nach einer Phase geringer Konzentrationen ein Hormonpeak kurz vor der Verpuppung auf.

4.2. Verlauf der Hormontiter in adulten Locusta migratoria-Weibchen

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Hämolymphtiter von Juvenilhormon und Ecdysteroiden während des ersten Eireifungszyklus von Locusta migratoria bestimmt.

Wie bereits von Rembold (1981) und Bergot et al. (1981b) festgestellt, ist Juvenilhormon III das einzige JH-Homologe, welches in adulten Locusta-Weibchen vorkommt. Die Eireifung bei Locusten verläuft nicht synchron. Selbst bei datierten Tieren (± 4 h), die im selben Käfig gehalten werden, findet die Eiablage nicht am gleichen Tag statt. Innerhalb einer Versuchsgruppe erstreckt sich der Zeitraum der Eiablagen über zwei bis drei Tage, wobei das Gros der Tiere gleichmäßig verteilt an zwei aufeinander folgenden Tagen die Gelege ablegt. Da sich die Tiere während der Vitellogenese in ihrem physiologischen Entwicklungszustand unterscheiden, wurde der Titerverlauf von Juvenilhormon und Ecdysteroiden in der Hämolymphe nebeneinander an einzelnen Individuen während des ersten Eireifungszyklus verfolgt. In gepoolten Hämolymphproben können weder Peaks der einzelnen Hormone, noch der Zusammenhang im Verlauf der beiden Hormontiter genau erfaßt werden.

4.2.1. Juvenilhormon

Während der Prävitellogenese sind die Juvenilhormonkonzentrationen in der Hämolymphe niedrig (Tab. 4); erst nach Tag 5 findet man einen Konzentrationsanstieg mit einem Maximum gegen Ende der Eireifung (Länge der terminalen Oocyten bei Tieren gleicher Entwicklungsstufe: 6 ± 0,5 mm). Vor der

Eiablage fällt der Juvenilhormontiter ab. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Johnson und Hill, die 1975 mit Hilfe des Galleria-Bioassays einen ähnlichen Titerverlauf mit einem Maximum bei einer Oocytenlänge von 5-6 mm feststellten. Der von ihnen beschriebene Peak zur Zeit der Adulthäutung wurde allerdings in dieser Arbeit nicht gefunden.

Die JH III-Konzentrationen der Hämolymphe, wie sie von Bergot et al. (1981b) und Huibregtse-Minderhoud et al. (1980) für Tag 11 bzw. Tag 18 nach der Adulthäutung gefunden wurden, liegen im selben Bereich wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen. Aus den Titerkurven einzelner Tiere wird deutlich, daß trotz der synchronen Entwicklung große individuelle Unterschiede im JH III-Gehalt der Hämolymphe bestehen. Messungen des Hormontiters im 10 bzw. 14 Stunden-Rhythmus zeigen, daß der JH III-Gehalt stark fluktuiert und innerhalb weniger Stunden Konzentrationsänderungen von über 11 pmol/10 µl Hämolymphe auftreten können. So ergibt sich aus den täglichen Messungen zwar der Titerverlauf, Spitzen- oder Minimalwerte werden mit dem vergleichsweise kurzen Zeitraster aber nicht immer erfaßt.

Die meisten Erkenntnisse über die Kontrolle des Juvenilhormons im erwachsenen Weibchen wurden mit Hilfe eines radio-chemischen Assays zur Bestimmung der JH-Biosynthese (Pratt und Tobe, 1974) erlangt. Am besten untersucht sind einige Dictyopteren und Orthopteren, wie Diploptera punctata, Nauphoeta cinerea, Periplaneta americana, Schistocerca gregaria, Melanoplus sanguinipes, (siehe dazu Stay und Tobe, 1985) und Gryllus bimaculatus (Koch und Hoffmann, 1985). Generell steigt die Aktivität der Corpora allata während der Prävitellogenese an und erreicht die höchsten Werte in der Phase des schnellen Oocytenwachstums. Zur Zeit der Eiablage besteht ein Aktivitätsminimum (Stay und Tobe, 1985).

Entsprechende Zyklen in den JH-Hämolymphtitern wurden bei Schistocerca gregaria (Porcheron et al., 1982), Acheta domesticus (Renucci und Strambi, 1983), Diploptera punctata (Tobe et al., 1985) und Nauphoeta cinerea (Lanzrein et al., 1985) nachgewiesen.

Die Hämolymphtiter von JH III in Locusta migratoria spiegeln die Biosyntheserate wieder (Couillaud et al., 1985; Schlagintweit, 1987). Couillaud et al. (1984) verglichen in verschiedenen Stadien der Eientwicklung die Hämolymphtiter von JH III mit der Syntheserate der Corpora allata und fanden dabei eine gute Übereinstimmung. Die jeweils höchsten Werte wurden ebenfalls am Ende der Eireifung gefunden.

Die individuellen Schwankungen im Hormontiter beruhen wahrscheinlich auf einer pulsartigen Biosyntheseaktivität der Corpora allata (Stay und Tobe, 1985). Bei Locusten wurde stets eine hohe Variabilität in der JH III-Biosyntheserate festgestellt (Locusta migratoria: Girardie et al., 1981; Schistocerca gregaria: Injeyan und Tobe, 1981); sie ist sogar bei Tieren zu beobachten, die aufgrund der Oocytenlänge physiologisch identisch sein sollten (Ferenz und Kaufner, 1981). Auch in ganzen Tieren mit gleicher Oocytenlänge wurden große Unterschiede im JH III-Gehalt gefunden (Rembold, 1981).

Eine hoch variable Aktivität der Corpora allata scheint bei Insekten häufig zu sein. Sie tritt zum Beispiel ebenso bei Leptinotarsa decemlineata (Khan et al., 1982) und bei Nauphoeta cinerea (Lanzrein et al., 1978) auf.

4.2.2. Ecdysteroide

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Locusta-Weibchen wurde zum Ende der Eireifung ein Ecdysteroidpeak in der Hämolymphe nachgewiesen.

Der Anstieg des Ecdysteroidtiters beginnt zu der Zeit, in der die Vitellogenintiter ihr Maximum überschreiten (LTO = 4,6 $\pm$ 0,7 mm). Einem raschen Konzentrationsanstieg folgt ein Absinken des Hormontiters vor der Eiablage (häufig bis unter die Nachweisgrenze). Da im erwachsenen Insekt die Prothoraxdrüse degeneriert ist, spiegelt der Titerverlauf die Synthese der Ecdysteroide in den Follikelzellen des Ovars wieder (Hoffmann et al., 1980).

Die ovariellen Ecdysteroide von Locusta wurden besonders von Hoffmann und seinen Mitarbeitern untersucht (Hoffmann et al., 1980, und Lagueux, 1983). Nach Stimulation durch einen

neurohormonalen Faktor, (Follikelzellen-stimulierendes Hormon, Charlet et al., 1979), werden in den Follikelzellen Ecdysteroide synthetisiert, in erster Linie Ecdyson und 2-Deoxy-Ecdyson. Die Mehrheit der Ecdysteroide wird in Form von Konjugaten, gebunden an Vitellin, in den Oocyten gespeichert (Lagueux et al., 1981). Nur ein geringer Prozentsatz (etwa 4%) wird in der Hämolymphe gefunden. Hoffmann und Lagueux gehen davon aus, daß die Ecdysteroide nur in den Eiern eine biologische Funktion erfüllen, während der Anteil in der Hämolymphe auf resorbierte Oocyten zurückzuführen sei. Gegen eine solche Annahme spricht aber die Reproduzierbarkeit des Ecdysteroidpeaks in der Hämolymphe, sowohl zeitlich als auch bezüglich der Konzentration. Die Entlassung von Ecdysteroiden in die Hämolymphe während der Resorption von Oocyten würde zum zufälligen Auftreten großer Ecdysteroidmengen im Blut führen. Dergleichen konnte nie nachgewiesen werden (Hagedorn, 1985). Weaver et al. (1984) untersuchten die Ecdysteroidtiter in Periplaneta americana und fanden in hungernden Weibchen keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der Oosorption und RIA-positivem Material in der Hämolymphe.

Die Konzentration von durchschnittlich 7×10^{-7} M (Spitzenwerte bei $1{,}5 \times 10^{-6}$ M), die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde ($4{,}5 \times 10^{-7}$ M werden von Hoffmann et al., 1980, angegeben), liegt im Bereich physiologisch wirksamer Hormonkonzentrationen. Dieser Befund weist darauf hin, daß die Ecdysteroide aktiv in die Hämolymphe sezerniert werden und dort eine spezifische Funktion haben.

Bei einer Vielzahl Insektenarten wurden bereits Ecdysteroide in adulten Insekten nachgewiesen (Übersicht: Hagedorn, 1985). In der Hämolymphe liegen die Konzentrationen zwischen 10^{-8} und 10^{-6} M. Ecdysteroide, die zum Ende der Eireifung in der Hämolymphe auftreten, wurden hauptsächlich in Dictyopteren (Blaberus craniifer: Bullière et al., 1979; Nauphoeta cinerea: Zhu et al., 1983; Periplaneta americana: Weaver et al., 1984) beschrieben, aber auch in Orthopteren (Schistocerca gregaria: Porcheron et al., 1982; Acheta domesticus: Renucci und Strambi, 1981) und in Galleria mellonella (Bollenbacher et al., 1978). Die Rolle der Ecdysteroide bei der Reproduktion ist noch weitgehend unklar; am besten un-

tersucht sind in dieser Hinsicht die Dipteren, in denen Ecdysteroide eine wichtige Funktion bei der Vitellogenese haben (Übersicht: Hagedorn, 1985).

4.3. Vitellogenintiter in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen

Vitellogenin wurde ab Tag 6 nach der Adulthäutung in der Hämolymphe weiblicher Locusta migratoria nachgewiesen. Die Titer erreichten an den Tagen 9-10 ein Maximum mit etwa 17 µg/µl Hämolymphe, sanken bis zur Eiablage ab und stiegen im 2. Eireifungszyklus erneut an. Untersuchungen von Gellissen und Emmerich (1978) und Chinzei und Wyatt (1985) an Locusta ergaben einen identischen Titerverlauf (unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dauer des ersten Eireifungszyklus). In beiden Fällen wurden die Titer einzelner Tiere gemessen. Die Konzentrationen, die von Gellissen und Emmerich (1978) angegeben werden, entsprechen den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werten. Chinzei und Wyatt (1985) hingegen berichten von höheren Spitzenwerten.

4.4. Hormontiter in der Hämolymphe adulter Locusta migratoria-Weibchen und ihre Beziehung zur Eireifung

Der Verlauf der Hormontiter in erwachsenen Weibchen ist eng mit der Eireifung gekoppelt. Juvenilhormon steuert sowohl die Vitellogeninsynthese im Fettkörper (Chen et al., 1976), als auch den Einbau des Dotterproteins in die Oocyten (Ferenz und Kaufner, 1981). Durch die Konzentrationserhöhung nach Tag 5 wird die Vitellogenese induziert.

Die Vitellogenintiter erreichen in der Hämolymphe ein Maximum an Tag 9-10; dies entspricht einer Länge der terminalen Oocyten von etwa 4 mm. Nach Ferenz (1978) ist die höchste Inkorporationsrate für Vitellogenin bei 4,7 mm Länge der terminalen Oocyten erreicht; danach nimmt sie ebenso wie die Vitellogeninsynthese ab. Goltzené und Porte (1978) zeigten durch Allatektomieversuche, daß die Eireifung nicht mehr von Juvenilhormon abhängig ist, nachdem die Länge der terminalen Oocyten 4 mm überschritten hat. Dennoch wird die Konzentra-

tion des Hormons in der Hämolymphe aufrecht erhalten und erreicht ein Maximum gegen Ende der Eireifung.

Die Abschaltung der Vitellogenese wird demnach nicht primär durch ein Absinken des Hormontiters oder völliges Fehlen des Hormons bewirkt. Ein Minimum der Juvenilhormontiter tritt erst auf, wenn die Vitellogenintiter bereits gefallen sind. Möglicherweise ist es während der Ovulation und Eiablage erforderlich, daß nur geringe JH-Konzentrationen in der Hämolymphe vorliegen. Nach der Eiablage steigen die Hormontiter wieder an und die Vitellogenese in den Oocyten zweiter Ordnung setzt ein.

Für Juvenilhormon ist zumindest zu Beginn der Eireifung eine klare Funktion - die Kontrolle der Vitellogenese - nachgewiesen. Dagegen stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Ecdysteroide in der Hämolymphe bei der Kontrolle der Eireifung und nach den wechselseitigen Beziehungen zwischen den beiden Hormontitern.

In der letzten Phase der Eireifung ist der Verlauf der Hämolymphtiter von Juvenilhormon und Ecdysteroiden gleichsinnig, mit einem Maximum während der Choriogenese und einem Minimum vor der Eiablage. Ein Eingriff in die hormonelle Steuerung durch Azadirachtin könnte zeigen, eine wie enge Kopplung der beiden Hormontiter vorliegt.

Eine Aufgabe für die Hämolymph-Ecdysteroide könnte die Steuerung der zyklischen Eireifung sein. Bei Locusta migratoria wird, ausgehend vom Ovar, über einen noch unbekannten Faktor in der fortgeschrittenen Phase der Eireifung die Vitellogeninsynthese gehemmt. In ovariektomierten Weibchen findet eine ununterbrochene Vitellogeninsynthese im Fettkörper statt; die Hämolymphtiter steigen dabei konstant an (Chinzei und Wyatt, 1985). Ecdysteroide erscheinen zu einem Zeitpunkt in der Hämolymphe, wenn die Vitellogenintiter ihr Maximum erreicht haben. Die Gegenläufigkeit der Titerkurven könnte für einen hemmenden Einfluß der Ecdysteroide sprechen.

Bei einigen Spezies gibt es deutliche Hinweise darauf, daß die Biosyntheserate der Corpora allata zum Ende der Eireifung durch Ecdysteroide aus dem Ovar gehemmt wird. Unter anderem an Leucophaea maderae wurde gezeigt, daß Injektion

von Ecdyson die durch Juvenilhormon induzierte Vitellogenese hemmt (Engelmann, 1979). In Diploptera punctata und Nauphoeta cinerea (Rankin und Stay, 1984; Lanzrein et al., 1981) ist die Aktivität der Corpora allata eng an die Entwicklung des Ovars gekoppelt. Ovariektomie-Versuche an Nauphoeta cinerea zeigten, daß das Ovar während der Eireifung zunächst stimulierend auf die Corpora allata wirkt, zum Ende der Eireifung inhibierend. Die Hemmung der JH-Biosynthese wird wahrscheinlich durch die Ecdysteroide hervorgerufen, die zur Zeit der Chorionbildung von den Ovarien in die Hämolymphe abgegeben werden (Lanzrein et al., 1981; Zhu et al., 1983). Nach der Implantation aktiver Prothoraxdrüsen in ovariektomierte (nach dem Peak der CA-Aktivität) Weibchen wurde die JH-Synthese in gleicher Weise wie durch ein reifendes Ovar gehemmt (Lanzrein et al., 1981). Stay et al. (1980) wiesen an Diploptera punctata den hemmenden Effekt des Ovars nach, indem sie die Biosyntheserate von Corpora allata untersuchten, die allein oder zusammen mit Ovarien in Männchen implantiert worden waren. Weiter zeigten sie, daß Injektion von 20-OH-Ecdyson in vivo die JH-Synthese verringert. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Wirkung, da sie in vitro nicht auftritt und der allatostatische Effekt in vivo erst nach 24 Stunden nachzuweisen ist (Friedel et al., 1980).

Der Verlauf der Vitellogenin- und Hormontiter in Locusta spricht gegen eine Abschaltung der Vitellogenese aufgrund einer Hemmung der Corpora allata durch Ecdysteroide.

Ecdysteroide in der Hämolymphe könnten über Feedback-Mechanismen die Einstellung der Ecdysonsynthese im Ovar bewirken und zudem als Signal dafür dienen, daß die Eireifung abgeschlossen ist. In Rhodnius prolixus stimulieren Ecdysteroide aus dem Ovar die medianen neurosekretorischen Zellen zur Freisetzung eines myotropen Hormons, welches Ovulation und Eiablage bewirkt (Ruegg et al., 1981; 1982). Im Zusammenhang mit einer solchen Rolle bei der Einleitung der Eiablage könnten Ecdysteroide zu diesem Zeitpunkt für eine Senkung der Juvenilhormontiter verantwortlich sein.

Bei der gesamten Oogenese spielen neurohormonale Steuerungsmechanismen eine große Rolle. In Locusta migratoria

wird die Synthese von Juvenilhormon durch ein Allatotropin stimuliert, das vermutlich in den medianen neurosekretorischen Zellen der Pars intercerebralis gebildet wird, über die NCC I (Nervi corporis cardiaci I) zu den Corpora cardiaca transportiert und dort in die Hämolymphe abgegeben wird (Stay und Tobe, 1985). Dieses Neuropeptid wurde kürzlich isoliert und teilweise charakterisiert (Schlagintweit, 1987). Ein inhibierender Effekt wird möglicherweise über die lateralen neurosekretorischen Zellen und die NCC II ausgeübt (Poras, 1983).

Die Phase der späten Oogenese, in der die Synthese und Ablagerung der Eihüllen sowie die Ecdysteroidsynthese stattfinden, steht ebenfalls unter neurohormonaler Kontrolle. Eine Elektrokoagulation der Pars intercerebralis oder Excision der Corpora cardiaca hat Störungen bei der Formung der Vitellinmembran sowie bei der Produktion des Chorionmaterials (Joly et al., 1978) zur Folge. Nach Charlet et al. (1979) induziert ein Neurohormon (FCTH) aus den medianen Zellen der Pars intercerebralis, das über die Corpora cardiaca abgegeben wird, die Ecdysonsynthese in den Follikelzellen.

Die interendokrinen regulatorischen Beziehungen zwischen Juvenilhormon und 20-Hydroxy-Ecdyson wurden am genauesten an Larvalstadien von Manduca sexta untersucht und von Watson et al. (1986) und Bollenbacher et al. (1987) beschrieben. Das Absinken des JH-Titers in den ersten Tagen des letzten Larvenstadiums ist erforderlich für die Ausschüttung von PTTH. Dieses organotrope Peptidhormon aktiviert die Prothoraxdrüsen zur Ecdysonsynthese. Daraus resultiert ein geringer Anstieg des Ecdysteroidtiters, der "commitment peak", der die Wanderphase und die Entwicklung zur Puppe einleitet. Er bewirkt gleichzeitig eine indirekte Stimulierung der Corpora allata via Gehirn und Corpora cardiaca. Der daraus folgende Peak im Juvenilhormontiter stimuliert wiederum indirekt die Prothoraxdrüsen zu einer verstärkten Biosynthese. Juvenilhormon regt den Fettkörper zur Freisetzung eines Proteins an, welches zusätzlich zu PTTH die Tätigkeit der Prothoraxdrüsen verstärkt. Möglicherweise beruht die modu-

lierende Aktivität dieses Proteins auf einer Transportfunktion für Substrate der Ecdysonbiosynthese.

Dieses Beispiel soll zeigen, wie Juvenilhormon und Ecdyson über Feedback-Mechanismen gegenseitig ihre Biosynthese regulieren können.

4.5. Wirkung von Azadirachtin auf adulte Locusta migratoria-Weibchen

Ein Einblick in das Zusammenspiel von Juvenilhormon und Ecdysteroiden und eventuelle gegenseitige Abhängigkeiten sollte durch die Anwendung von Azadirachtin gewonnen werden. Azadirachtin ist eine Substanz, die in endokrin gesteuerte Entwicklungsvorgänge eingreift (Rembold und Sieber, 1981; Redfern et al, 1982; Sieber und Rembold, 1983; Garcia und Rembold, 1984). Bisher wurde vorwiegend der Einfluß von Azadirachtin auf die Metamorphose untersucht, insbesondere seine Wirkung auf Ecdysteroide. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung auf die Reproduktion, wobei erstmals der Effekt auf die Titer von Juvenilhormon und der Ecdysteroide im gleichen Tier untersucht wurde.

4.5.1. Einfluß von Azadirachtin auf die Reproduktion

Azadirachtin bewirkt dosisabhängig Entwicklungsstörungen bei adulten Locusta migratoria-Weibchen. Eine Azadirachtininjektion von mehr als 3 µg/g während der Prävitellogenese hat eine hohe Mortalität zur Folge. Die Substanz wirkt nicht unmittelbar toxisch. Zwischen der Injektion und dem Tod der Tiere liegen stets mindestens zwei Tage. Die höchste Sterblichkeit tritt zwischen sieben und zehn Tagen nach der Injektion auf.

Die fehlende Gewichtszunahme und die hohe Mortalität im Bereich höherer Dosen mag vorwiegend bedingt sein durch die Fraßhemmung, die durch Azadirachtin hervorgerufen wird (Sieber, 1982). Andere Effekte, die im Bereich niedriger Dosen (unter 3,5 µg/g) auftreten, sind jedoch nicht ausschließlich durch einen "Hungereffekt" zu erklären. Bei Weibchen, denen in der Prävitellogenese das Futter entzogen

wird, findet keine Oogenese statt und ihr Gewicht nimmt stetig ab (Tobe und Chapman, 1979). Im Gegensatz zu hungernden Weibchen werden in mit Azadirachtin behandelten Tieren Eier entwickelt und die Weibchen können, wenn auch verspätet, das Körpergewicht der Kontrollen erreichen. Ein spezifischer Effekt von Azadirachtin auf Entwicklungsvorgänge äußert sich in Störungen bei der Oogenese, die bereits mit sehr niedrigen Dosen (0,5 µg/g) festzustellen sind. In erster Linie ist der zeitliche Ablauf des ersten Eireifungszyklus betroffen. Er ist gegenüber normalen Tieren um einige Tage verlängert. Gelege, die verspätet abgelegt werden, enthalten in der Regel eine geringere Anzahl Eier, die sich jedoch normal entwickeln. Das Ausschlüpfen der Larven findet im normalen Zeitraum statt, ebenso ihr Heranwachsen zu adulten Tieren. Bei adulten Disdercus königii-Weibchen hat Azadirachtin keinen Einfluß auf das Fraßverhalten der Tiere, bewirkt aber - wie bei Locusta - eine Inhibierung der Eientwicklung und eine hohe Mortalität (Koul, 1984b).

Daß es sich bei Fraßhemmung und Entwicklungsstörungen um zwei unterschiedliche Effekte handelt, wurde auch an Larvalstadien einiger Insektenarten festgestellt (Rembold et al., 1981; Redfern et al., 1981; Koul, 1984a). In Rhodnius prolixus beträgt die ED_{50} für die fraßabschreckende Wirkung das 625-fache der häutungshemmenden Dosis (Garcia und Rembold, 1984). Locusta migratoria-Larven können sich trotz Futterentzugs und dadurch vermindertem Körpergewicht erfolgreich häuten, während bei Azadirachtin-behandelten Larven die Häutung inhibiert ist. Dies trifft auch auf Tiere zu, die nach Injektion einer niedrigen Dosis ein den Kontrollen entsprechendes Körpergewicht erreichen (Sieber und Rembold, 1983).

Die Injektion von Azadirachtin in adulte Locusta migratoria-Weibchen bewirkt eine dosisabhängige Reduzierung der Fruchtbarkeit, sei es durch eine vollständige Inhibition der Oogenese oder durch eine verzögerte Eireifung, gekoppelt mit einer verminderten Anzahl von Oocyten. Eine permanente Inhibition der Eientwicklung ist fast immer mit einem frühzeitigen Tod der Tiere verbunden. Die größte Sterblichkeit tritt in der Zeit auf, während der unbehandelte Weibchen Eier legen. Nur selten überleben Tiere ohne Eientwicklung länger

als 20 Tage. Mit steigender Dosis sinkt der Anteil der Weibchen mit Eireifung. Der zeitliche Ablauf bei einer verzögerten Eireifung ist dagegen unabhängig von der Dosis.

Die heterogene Reaktion der Tiere, die im Bereich von Azadirachtinkonzentrationen unter 3,5 µg/g auftritt, erfordert eine getrennte Betrachtung der hervorgerufenen Effekte. Vor allem bei Tieren mit einer verzögerten Eireifung ist die Untersuchung einzelner Weibchen unumgänglich, da die Eiablage in weit größerem Maß als bei Kontrolltieren über Tage verstreut erfolgt. Titerbestimmungen in der Hämolymphe können daher nicht in gepoolten Proben vorgenommen werden. Dabei würden weder der Zeitpunkt noch die Konzentration von Hormonpeaks exakt erfaßt werden.

4.5.2. Einfluß von Azadirachtin auf die Hormontiter

Azadirachtin beeinflußt die peripheren Hormone, Juvenilhormon und Ecdysteroide, in gleicher Weise. In Weibchen ohne Eireifung ist kein Anstieg der Hormonkonzentrationen in der Hämolymphe zu beobachten. Die Juvenilhormontiter sind sehr niedrig, zum Teil unter der Nachweisgrenze. Die geringen Hormonmengen reichen nicht aus, die Vitellogenese zu induzieren. Das Fehlen von Ecdysteroiden in Tieren ohne Eientwicklung zeigt einmal mehr, daß der einzige Syntheseort in adulten Locusta-Weibchen das reifende Ovar ist.

Bei einer verzögerten Eireifung ist das Auftreten der maximalen Hormontiter in der Hämolymphe zeitlich verschoben. Der Anstieg von Juvenilhormon und das Einsetzen der Vitellogenese erfolgen einige Tage später als bei unbehandelten Weibchen. Die Untersuchung von Einzeltieren zeigte, daß die Spitzenkonzentrationen der Hormone denen der Kontrollen entsprechen. Der verlangsamte Ablauf der Eireifung hat zur Folge, daß das Maximum der Juvenilhormontiter nun vor dem der Ecdysteroidtiter auftritt. Abgesehen von der zeitlichen Dehnung bleibt der Titerverlauf aber unverändert. Auf die Maxima beider Hormone folgen minimale Titer vor der Eiablage.

Ein ähnlicher Effekt auf die Hormontiter wurde auch bei Larven verschiedener Spezies beobachtet.

Azadirachtin bewirkt, abhängig von der Konzentration und vom Injektionszeitpunkt, Metamorphosestörungen in Form einer Verzögerung der Häutung, erfolgloser Häutungsversuche oder der völligen Inhibiton der Häutung, wobei sogenannte Dauerlarven entstehen können. Diese Effekte sind verbunden mit Störungen des Ecdysteroidtiterverlaufs (Redfern et al., 1982; Sieber und Rembold, 1983; Schlüter et al., 1985; Garcia et al., 1986; Dorn et al., 1986 ; Mordue et al., 1986). Neben einer rein zeitlichen Verschiebung des Ecdysteroidpeaks kann eine Reduktion des Peakmaximums auftreten. Bei Locusta- (Sieber und Rembold, 1983) oder Manduca-Larven (Schlüter et al., 1985) mit erfolglosen Häutungs- bzw. Verpuppungsversuchen treten die Ecdysteroidpeaks verspätet auf. Zudem erfolgt der Konzentrationsanstieg langsamer als bei Kontrolltieren, obwohl die selben Maximalwerte erreicht werden. Daß bei diesen Tieren Ecdyson-induzierte Prozesse wie Apolyse und Cuticulogenese auftreten, gleichzeitig jedoch die Häutung nicht vollzogen werden kann, wird mit einer Beeinflußung des Eclosionshormons interpretiert, bedingt durch den unnatürlichen Titerverlauf von Ecdyson oder eine Blockierung der Ausschüttung des Neurohormons (Sieber und Rembold, 1983). Bei Dauerlarven sind die Ecdysteroidkonzentrationen permanent zu niedrig, um eine Häutung zu induzieren (Sieber und Rembold, 1983; Dorn et al., 1986).

Im Gegensatz zu solchen Larven mit einer irreversiblen Häutungsinhibition, die lange Zeit überleben (Rhodnius prolixus-Dauerlarven leben mehrere Monate, Garcia und Rembold, 1984), ist bei adulten Locusta migratoria eine vollständige Entwicklungshemmung (inhibierte Oogenese) mit hoher Mortalität verbunden.

4.5.3. Einfluß von Azadirachtin auf die Vitellogenese

In mit Azadirachtin behandelten Weibchen sind die Vitellogeninkonzentrationen in der Hämolymphe deutlich erniedrigt. Dieser Effekt wird unabhängig von den Juvenilhormontitern hervorgerufen. Die Vitellogenese im Fettkörper wird dosisabhängig von Juvenilhormon gesteuert (Chen et al., 1979). Trotz der normalen Konzentrationen, die bei der ver-

späteten Eireifung auftreten, werden nicht die Vitellogenintiter der Kontrollen erreicht. Zudem bleibt das Verhältnis von Vitellogenin zu Gesamtprotein erhalten, es wird also nicht spezifisch die Vitellogeninproduktion beeinflußt, sondern generell die Proteinkonzentration in der Hämolyphe gesenkt. Ein reduzierter Proteingehalt in mit Azadirachtin behandelten Weibchen wurde auch von Sieber (1982) an Locusta migratoria und von Subrahmanyam und Rao (1986) an Schistocerca gregaria festgestellt. Sie machten jedoch keine quantitative Vitellogeninbestimmung. Die Verringerung der Vitellogeninkonzentration hat zur Folge, daß sich weniger Eier entwickeln. Die Inkorporation von Vitellogenin in die Oocyten findet offenbar unbehindert statt, wie das Schlüpfen normaler Larven vermuten läßt.

Diese Befunde zeigen, daß neben Juvenilhormon auch andere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Vitellogenese spielen und daß Azadirachtin einen Einfluß auf diese Faktoren hat. Die Wirkung von Azadirachtin wird zudem durch die Behandlung mit dem JH-Analogen Hydropren nicht aufgehoben.

Couillaud et al. (1984) fanden, daß die Eireifung auch bei sehr niedrigen JH-Biosyntheseraten, wie sie nach Durchtrennung des NCA I (Nervus corpori allati I) auftreten, normal verläuft. Dies weist ebenfalls auf eine Beteiligung weiterer Regulationsmechanismen hin. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein Neurohormon, welches die Proteinsynthese im Fettkörper stimuliert (Davey, K.G., 1984).

4.6. Zum Wirkungsmechanismus von Azadirachtin

Es wurde gezeigt, daß Azadirachtin den Titerverlauf der peripheren Hormone, Juvenilhormon III und Ecdysteroide, in gleichsinniger Weise beeinflußt und es außerdem eine permanente Wirkung auf die Proteinsynthese hat. Dieser Befund schließt eine spezifische Wirkung der Substanz auf nur eines der beiden untersuchten Hormone aus. Weiter spricht dagegen, daß eine Behandlung mit einem Juvenilhormonanalogen oder mit 20-Hydroxy-Ecdyson (Sieber, 1982; Schlüter et al., 1985) die Wirkung von Azadirachtin bei Locusta migratoria bzw. Manduca

sexta nicht aufheben kann (nach Garcia und Rembold, 1984, ist dies bei Rhodnius prolixus jedoch möglich).

Die Fähigkeit zur Hormonbiosynthese bleibt sowohl in den Corpora allata als auch in den Follikelzellen des Ovars normal erhalten. Sieber (1982) zeigte durch histologische Untersuchungen an Locusta, daß Azadirachtin keine cytotoxische Wirkung auf die Corpora allata hat, wie etwa Precocen (Bowers et al., 1976), welches eine "chemische Allatektomie" verursacht. Die normalen Konzentrationen der Juvenilhormontiter bei einer verzögerten Eireifung lassen eine selektive Störung der enzymatischen JH-Biosynthese unwahrscheinlich erscheinen. Eine solche würde auch weitere Effekte von Azadirachtin nicht erklären. So führt zum Beispiel eine Behandlung während der späten Vitellogenese zu einer Reduktion der Ecdysteroidsynthese im Ovar und als unmittelbare Folge zu schweren Störungen der Embryogenese (Rembold und Sieber, 1981; Sieber, 1982). Diese Wirkung von Azadirachtin tritt in einem Zeitabschnitt auf, in dem Juvenilhormon keine Rolle bei der Eireifung spielt (Goltzene und Porte, 1978).

Koul et al. (1987) zeigten durch in vitro Experimente, daß Azadirachtin keinen unmittelbaren Einfluß auf die Ecdysonsynthese in den Prothoraxdrüsen oder ihre Stimulierung durch PTTH hat.

Für eine Rolle von Azadirachtin als Ecdysonantagonist mit einer direkten Wirkung auf Ecdysonrezeptoren, wie sie von Käuser und Koolmann (1984) postuliert wird, ergeben sich aus dieser Arbeit keine Anhaltspunkte. Bei der Anwendung von Azadirachtin während der Prävitellogenese tritt eine Wirkung auf Ecdyson-unabhängige Prozesse wie die Induzierung der Vitellogenese ein. Sowohl von Sieber und Rembold (1983) als auch von Koul et al. (1987) wurde im RIA keine Kreuzreaktivität zwischen Ecdyson und Azadirachtin festgestellt. Gegen einen Antagonismus aufgrund der Strukturähnlichkeit der Moleküle spricht auch, daß verschiedene Azadirachtinderivate ebenfalls wachstumshemmende Aktivität besitzen (Rembold, 1984).

Die Befunde dieser Arbeit bekräftigen die Ansicht verschiedener Autoren (z.B. Rembold und Sieber, 1981; Dorn et al., 1986; Koul et al., 1987;), daß Azadirachtin endokrin

gesteuerte Entwicklungsvorgänge durch eine Interaktion mit neurosekretorischen Zentren beeinflußt.

Nach Injektion von Azadirachtin während der Prävitellogenese von Locusta ist die Eientwicklung zunächst blockiert. Dies äußert sich in niedrigen JH-Titern und einer geringeren Proteinsynthese, Symptome, die auch durch Eingriffe in das neurosekretorische System hervorgerufen werden. Eine Hemmung der Eireifung kann außer durch eine Allatektomie (Goltzené und Porte, 1978) auch durch Elektrokoagulation der medianen neurosekretorischen Zellen (McCaffery, 1976; Tobe et al., 1982), über eine Durchtrennung von deren nervöser Verbindung zu den Corpora cardiaca (Ulrich et al., 1985) oder durch anti-Gehirn-Antikörper (Rembold et al., 1980) bewirkt werden. Mit den genannten Manipulationen wird unter anderem die Stimulierung der Corpora allata durch das allatotrope Hormon verhindert.

Von Sieber (1982) und Subrahmanyam und Rao (1986) wurde festgestelllt, daß nach Azadirachtininjektion eine Akkumulation neurosekretorischer Produkte in den medianen neurosekretorischen Zellen auftritt. Ein solcher histologischer Befund wird mit einer blockierten Ausschüttung von Neurohormonen interpretiert (Highnam, 1976).

Der Wirkungsmechanismus von Azadirachtin bestünde danach in einer Hemmung von Transportmechanismen an Zellmembranen. Nach Rembold et al. (1987) wird fast unabhängig von der injizierten Konzentration eine konstante Menge von etwa einem halben µg Azadirachtin pro Gramm Körpergewicht im Tier zurückgehalten, die fest gebunden vorliegt. Eine Bindung an Rezeptorproteine im Bereich neurosekretorischer Zentren könnte in einer Hemmung der Ausschüttung von Neurohormonen resultieren. Ein Wirkungsmechanismus dieser Art erklärt die unterschiedlichen Effekte (siehe dazu 4.5.2.), die in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt von Azadirachtin auftreten, da jeweils andere Neurohormone betroffen wären.

Im Falle adulter Weibchen würde es sich dabei während der Prävitellogenese vor allem um das allatotrope Hormon handeln, welches durch die Stimulierung der Corpora allata für die Induzierung der Vitellogenese sorgt. Die niedrigen Juvenilhormontiter und die fehlende Vitellogenese stehen mit

dieser Hypothese im Einklang. Aus dem Befund, daß die Injektion von 3 µg Azadirachtin an Tag 1 nach der Adulthäutung eine deutlich geringere Eireifungshemmung zur Folge hat als an Tag 3 oder 4, ergäbe sich dann der Schluß, daß die Ausschüttung von ATH nicht unmittelbar nach der Adulthäutung erfolgt.

In der späten Vitellogenese wäre mit der Inhibition der Ausschüttung von FCTH die Stimulierung der Ecdysteroidsynthese im Ovar unterbunden, ein Effekt, der von Rembold und Sieber (1981) bereits beschrieben wurde.

Daß Azadirachtin durch einen Eingriff auf der Ebene induzierender neurosekretorischer Faktoren vor allem die zeitliche Korrelation der hormonellen Steuerung stört, zeigt sich in seiner Wirkung auf den Titerverlauf der peripheren Hormone. Hormonpeaks während der Eireifung oder während der Larvalentwicklung treten nicht zum normalen Zeitpunkt auf, sind aber nicht permanent inhibiert (außer bei Tieren, die vorzeitig sterben). Selbst bei Dauerlarven setzen nach einiger Zeit (über 20 Tage) wieder hormonelle Regulationsmechanismen ein. Sie betreffen jedoch Entwicklungsvorgänge, wie sie normalerweise nur bei adulten Tieren auftreten. So zeigen männliche Dauerlarven von Locusta das Sexualverhalten erwachsener Männchen (Shalom und Pener, 1984), weibliche Dauerlarven weisen Ansätze zur Eientwicklung auf. Sieber (1982) konnte bei mit Azadirachtin behandelten Locusta-Larven Vitellogenin in der Hämolymphe nachweisen, Dorn et al. (1986) fanden unterschiedlich entwickelte Oocyten bei Oncopeltus fasciatus.

Bei solchen Tieren wird die Adulthäutung durch Azadirachtin irreversibel verhindert, die Initiation adulter Entwicklungsvorgänge zeigt aber, daß die Wirkung der Substanz mit der Zeit nachläßt. Rembold (1984) erklärt dieses Phänomen mit einer teilweisen Aufhebung der Wirkung durch Turn-Over von das Azadirachtin bindenden Rezeptorproteinen.

Ein solcher Prozess tritt vielleicht auch bei der verspäteten Eireifung adulter Weibchen auf, müßte in diesem Fall jedoch wesentlich schneller einsetzen. Eine völlige Aufhebung der Wirkung von Azadirachtin findet nie statt. Weder erfolgt bei Larven eine normale Adultentwicklung, noch er-

langen adulte Weibchen ihre uneingeschränkte Reproduktionsfähigkeit zurück.

Während der Eireifung von Locusta migratoria sind folgende interendokrine Regulationsmechanismen von Juvenilhormon und Ecdysteroiden denkbar: Juvenilhormon hat zwar keinen direkten Einfluß auf die Ecdysteroidsynthese (Joly et al., 1978), könnte sie aber während der Vitellogenese indirekt induzieren. Eine Möglichkeit dazu besteht in einer Stimulierung der Ausschüttung von FCTH, eine weitere in der Stimulierung des Fettkörpers zur Bereitstellung von Substraten der Biosynthese (wie es bei Manduca-Larven postuliert wird). Ferner ist vorstellbar, daß die Follikelzellen erst durch die Einwirkung von Juvenilhormon die Kompetenz zur Ecdysteroidsynthese erlangen. Die wahrscheinlichste Funktion der Ecdysteroide besteht in der Einleitung der Eiablage. Eine direkte Hemmung der Vitellogenese durch Ecdysteroide erscheint aufgrund des Vitellogenintiterverlaufs möglich. Der gleichsinnige Titerverlauf von Ecdysteroiden und Juvenilhormon mit einem gemeinsamen Minimum läßt vermuten, daß im Fall einer Hemmung der CA-Aktivität durch Ecdysteroide diese dazu dient, zur Zeit der Eiablage niedrige JH-Konzentrationen zu garantieren.

Eine Injektion von Azadirachtin während der Prävitellogenese bewirkt keine Störungen derartiger Wechselwirkungen zwischen Juvenilhormon und Ecdyson. Der zeitliche Zusammenhang im Verlauf der beiden Hormontiter (hohe Konzentrationen zum Ende der Eireifung und ein gemeinsames Minimum zur Eiablage) bleibt im wesentlichen erhalten. Die Effekte von Azadirachtin erklären sich aus einer Wirkung auf übergeordnete Koordinationszentren, durch die beide Hormone in gleicher Weise betroffen sind. Die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten auf die Beeinflussung eines "Zeitgebers", einer inneren Uhr, die Entwicklungsvorgänge zum richtigen Zeitpunkt einleitet. Der verspätete Anstieg der Hormonkonzentrationen könnte die Folge einer verzögerten Ausschüttung der induzierenden Neurohormone ATH und FCTH sein.

5. Zusammenfassung

1. Locusta migratoria-Larven des vierten (vorletzten) und fünften (letzten) Stadiums enthalten nur geringe Konzentrationen an Juvenilhormon III. Jeweils vor den Häutungen fehlt Juvenilhormon in der Hämolymphe. Zwischen männlichen und weiblichen Larven (viertes Stadium) wurden keine Unterschiede im Hormongehalt festgestellt. Im fünften Larvenstadium waren die Juvenilhormonkonzentrationen niedriger als im vorletzten; das Hormon wurde dort nur noch in Spuren gefunden.

2. An erwachsenen Locusta-Weibchen wurde erstmals der Titerverlauf von Juvenilhormon III und Ecdysteroiden an Einzeltieren während ihres ersten Eireifungszyklus untersucht. Den Versuchstieren wurden täglich 10 µl Hämolymphe entnommen und beide Hormone nebeneinander bestimmt. Die Juvenilhormontiter sind nach der Adulthäutung zunächst niedrig und steigen während der Vitellogenese an. Ecdysteroide wurden stets zum Ende der Eireifung in der Hämolymphe gefunden. Zur Zeit des Ecdysteroidpeaks (Tag 11) sind auch die höchsten Konzentrationen an Juvenilhormon vorhanden. JH- und Ecdysteroidtiter fallen gemeinsam vor der Eiablage ab und beide steigen im zweiten Eireifungszyklus wieder an.

3. Vitellogenin wurde ebenfalls an Einzeltieren bestimmt. Sein Gehalt in der Hämolymphe entspricht etwa einem Drittel der Gesamtproteine. Vitellogenin erscheint ab Tag 6 in der Hämolymphe und erreicht die höchste Konzentration an Tag 9 oder 10. Danach sinkt der Vitellogenintiter rasch auf ein Minimum vor der Eiablage und steigt erst im zweiten Eireifungszyklus wieder an.

4. Injektion von Azadirachtin während der Prävitellogenese bewirkt dosisabhängig eine Hemmung der Eientwicklung und eine erhöhte Mortalität. Dosen ab 4 µg/g Körpergewicht wirken stets letal. Nach Injektion von 3 µg/g an Tag 3 nach der Adulthäutung ist die Eientwicklung bei etwas mehr als 60% der Tiere völlig unterbunden. Mit wenigen

Ausnahmen sterben diese Weibchen innerhalb von 12 bis 14 Tagen. Bei den anderen Tiere ist die Eientwicklung gegenüber unbehandelten Weibchen verzögert. Es werden weniger Eier abgelegt, aus denen aber Larven mit normal ablaufender Entwicklung schlüpfen.

5. Azadirachtin beeinflußt den Titerverlauf von Juvenilhormon und Ecdysteroiden in gleicher Weise. Die Maxima der Hormontiter treten gegenüber unbehandelten Weibchen verspätet, aber in den Kontrollen entsprechender Konzentration auf. In Tieren mit inhibierter Eireifung ist Juvenilhormon in geringen Konzentrationen vorhanden, Ecdysteroide fehlen ganz. Vitellogenin wird in solchen Weibchen nicht gebildet. Bei verspäteter Eientwicklung ist die Vitellogenese verzögert und der Vitellogenintiter niedriger als bei unbehandelten Weibchen. Gleichzeitig ist die Konzentration von Gesamtprotein deutlich erniedrigt. Der Anteil von Vitellogenin am Gesamtprotein jedoch ist gegenüber den Kontrollen nicht verringert. Dies zeigt, daß nach Behandlung mit Azadirachtin auch andere Hämolymphproteine in geringeren Konzentrationen vorhanden sind und somit keine spezifische Reduktion von Vitellogenin vorliegt.

6. Azadirachtin wirkt vermutlich auf übergeordnete, neurosekretorische Steuerungszentren von Locusta. Daraus erklären sich die unterschiedlichen Effekte einer permanenten Reduktion des Proteingehalts und einer zeitlichen Verschiebung der Oogenese. Ein direkter antagonistischer Einfluß auf eines der peripheren Hormone liegt nicht vor. Die Synchronie zwischen Juvenilhormon- und Ecdysteroidtiter bei der Eireifung wird durch Azadirachtin nicht beeinflußt.

6. Literaturverzeichnis

Baehr, J.-C., Porcheron, P., Papillon, M., und Dray, F. (1979): Haemolymph levels of juvenile hormone, ecdysteroids and protein during the last two larval instars of Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 25, 415-421

Bergot, B.J., Ratcliff, M. und Schooley, D.A. (1981a): Method for quantitation of the four known juvenile hormones in insect tissues using gaschromatography-mass spectroscopy. J. Chromatogr. 204, 231-244

Bergot, B.J., Schooley, D.A. und de Kort, C.A.D. (1981b): Identification of JH III as the principal juvenile hormone in Locusta migratoria. Exp. 37, 909-910

Bollenbacher, W.E., Zvenko, H., Kumaran, A.K. und Gilbert, L.I. (1978): Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth Galleria mellonella: The role of the ovary. Gen. Comp. Endocrinol. 34, 169-179

Bollenbacher, W.E., Granger, N.A., Katahira, E.J. und O'Brien, M.A. (1987): Developmental endocrinology of larval molting in the tobacco hornworm, Manduca sexta. J. Exp. Biol. 128, 175-192

Borst, D.W. und O'Connor, J.D. (1972): Arthropod molting hormone: Radioimmuneassay. Science 178, 418-419

Borst, D.W. und O'Connor, J.D. (1974): Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay. Steroids 24, 637-656

Bowers, W.S., Otha, T., Cleere, J.H. und Marsella, P.A. (1976): Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science 193, 542-547

Bownes, M. und Rembold, H. (1987): The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the life cycle of Drosophila melanogaster. Eur. J. Biochem. 164, 709-712

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Bioch. 72, 248-254

Bührlen, U., Emmerich, H. und Rembold, H. (1984): Titer of JH III in Drosophila hydei during metamorphosis determined by GC-MS-MIS. Z. Naturforsch. 39C, 1150-1154

Bullière D., Bullière, F. und de Reggi, M. (1979): Ecdysteroid titres during ovarian and embryonic development in Blaberus craniifer. Wilhelm Roux's Arch. 186, 103-114

Butenandt, A. und Karlson, P. (1954): Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. 9B, 389-391

Butterworth, J.H. und Morgan, F.D. (1968): Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. Chem. Ber. 23-24

Charlet, M., Goltzené, F. und Hoffmann, J.A. (1979): Experimental evidence for a neuroendocrine control of ecdysone biosynthesis in adult females of Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 25, 463-466

Chen, T.T., Couble, P., de Lucca, F.L. und Wyatt, G.R. (1976): Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in Locusta migratoria. In: The Juvenile Hormones (Ed. L.I. Gilbert), New York Plenum Press, 505-529.

Chen, T.T., Couble, P., Abu-Hakima, R. und Wyatt, G.R. (1979): Juvenile hormone-controlled vitellogenin synthesis in Locusta migratoria fat body. Hormonal induction in vivo. Develop. Biol. 69, 59-72

Chinzei, Y., White, B.B. und Wyatt, G.R. (1982): Vitellogenin mRNA in locust fat body: identification, isolation, and quantitative changes induced by juvenile hormone. Can. J. Bioch. 60, 243-251

Chinzei, Y. und Wyatt, G.R. (1985): Vitellogenin titre in haemolymph of Locusta migratoria in normal adults, after ovariectomy, and in response to methoprene. J. Insect Physiol. 31, 441-445

Couillaud, F., Girardie, J., Tobe, S.S. und Girardie, A. (1984): Activity of disconnected corpora allata in Locusta migratoria: Juvenile hormone-biosynthesis in vitro and physiological effects in vivo. J. Insect Physiol. 30, 551-556

Couillaud, F., Mauchamp, B. und Girardie, A. (1985): Regulation of juvenile hormone titer in African locust. Exp. 41, 1165-1167

Crotte, C., Mulé, A. und Planche, N.E. (1970): Générateur de diazométhane destinée à la chromatographie en phase gazeuse, des produits biologiques. Soc. Chimie biol., 108

Dahm, K.H., Trost, B.M. und Röller, H. (1967): The juvenile hormone. V. Synthesis of the racemic juvenile hormone. J. Amer. Chem. Soc. 89, 5292-5294

Davey, K.G. (1984): Neuroendocrine controls on insect reproduction. In: Insect Neurochemistry and Neurophysiology (Ed. A.B. Borkovec und T.J. Kelly), Plenum Press, New York, 93-113

de Kort, C.A.D. und Granger, N.A. (1981): Regulation of the juvenile hormone titer. Ann. Rev. Entomol. 26, 1-28

Dorn, A., Rademacher, J.M. und Sehn, E. (1986): Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, Oncopeltus fasciatus. J. Insect Physiol. 32, 231-238

Engelmann, F. (1979): Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. Adv. Insect Physiol. 14, 49-108

Engelmann, F. (1983): Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. In: Endocrinology of Insects (Eds. R.G.H. Downer und H. Laufer), Liss, New York, 259-270

Ferenz, H.J. (1978): Uptake of vitellogenin into developing oocytes of Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 24, 273-278

Ferenz, H.J. und Kaufner, I. (1981): Juvenile hormone synthesis in relation to oogenesis in Locusta migratoria. In: Juvenile Hormone Biochemistry (Eds. G.E. Pratt und G.T. Brooks), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 135-144

Friedel, T., Feyereisen, R. , Mundall, E.C. und Tobe S.S (1980): The allatostatic effect of 20-OH-ecdysone on the adult viviparous cockroach, Diploptera punctata. J. Insect Physiol. 26, 665-670

Garcia, E.S. und Rembold, H. (1984): Effects of azadirachtin on ecdysis of Rhodnius prolixus. J. Insect Physiol. 30, 939-941

Garcia, E.S, Uhl, M. und Rembold, H. (1986): Azadirachtin, a chemical probe for the study of moulting process in Rhodnius prolixus. Z. Naturforsch. 41C, 771-775

Gellissen, G., Wajc, E., Cohen, E., Emmerich, H., Applebaum, S.W. und Flossdorf, J. (1976): Purification and properties of oocyte vitellin from the migratory locust. J. Comp. Physiol. 108, 287-301

Gellissen, G. und Emmerich, H. (1978): Changes in the titer of vitellogenin and of diglyceride carrier lipoprotein in the blood of adult Locusta migratoria. Insect Biochem. 8, 403-412

Gellissen, G. und Wyatt, G.R. (1981): Production of lipophorin in the fat body of adult Locusta migratoria: comparison with vitellogenin. Can. J. Biochem. 59, 648-654

Girardie, J., Tobe, S.S. und Girardie, A. (1981): Biosynthèse de l'hormone juvenile C-16 (JH III) et maturation ovarienne chez le criquet migrateur. C.R. Acad. Sci. 293, 443- 446

Goltzené, F. und Porte, A. (1978): Endocrine control by neurosecretory cells of the pars intercerebralis and the corpora allata during the earlier phases of vitellogenesis in Locusta migratoria migratorioides R and F (Orthoptera). Gen. Comp. Endocrinol. 35, 35-45

Hagedorn, H.H. (1985): The role of ecdysteroids in reproduction. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol.7 (Eds. G.A. Kerkut und L.I. Gilbert), Pergamon, Oxford, 205-262

Highnam, K.C. (1976): Neurosecretory activity in locusts. Acrida 5, 6-24

Hoffmann, J.A., Lagueux, M., Hetru, C., Charlet, M. und Goltzené, F. (1980): Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of insects. In: Progress in Ecdysone Research (Ed. J.A. Hoffmann), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 431-465

Hoffmeister, H. und Grützmacher, H. (1966): Zur Chemie des Ecdysterons. Tetrahedon Lett. 33, 4017-4023

Huber, R.und Hoppe, W. (1965): Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatischen Faltmolekülmethode. Chem. Ber. 98, 2403-2424.

Huibregtse-Minderhoud, L., van den Hondel-Franken, M.A.M., van der Kerk-van Hoof, A.C., Biessels, H.W.A., Salemink, C.A., van der Horst, D.J. und Beenakkers, M. Th. (1980): Quantitative determination of the juvenile hormones in the haemolymph of Locusta migratoria during normal development and after implantation of corpora allata. J. Insect Physiol. 26, 627-631

Injeyan, H.S. und Tobe, S.S. (1981): Phase polymorphism in Schistocerca gregaria: assessment of juvenile hormone synthesis in relation to vitellogenesis. J. Insect Physiol. 27, 203-210

Johnson, R.A. und Hill, L. (1973): The activity of the corpora allata in the fourth and fifth instars of the migratory locust. J. Insect Physiol. 19, 1921-1932

Johnson, R.A. und Hill, L. (1975): Activity of the corpora allata in the adult female migratory locust. J. Insect Physiol. 21, 1517-1519

Joly, L., Goltzené, F. und Porte, A. (1978): L'action ecercée par l'appareil endocrine sur les phases tardives de l'ovogenèse chez Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 24, 187-193

Karlson, P. (1956): Biochemical studies on insect hormones. Vit. Horm. 14, 227-266

Karlson, P., Hoffmeister, H., Hummel, H., Hocks, P. und Spiteller, G. (1965): Zur Chemie des Ecdysons VI. Reaktionen des Ecdysonmoleküls. Chem. Ber. 98, 2394-2402

Käuser, G. und Koolman, J. (1984): Ecdysteroid receptors in tissues of the blowfly, Calliphora vicina. In: Advances in Invertebrate Reproduction 3 (Ed. W. Engels), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 602

Khan, M.A., Koopmanschap, A.B., Privee, H. und de Kort, C.A.D. (1982): The mode of regulation of the corpus allatum activity during starvation in adult females of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say). J. Insect Physiol., 28, 791-796.

Koch, P.B. und Hoffmann, K.H. (1985): Juvenile hormone and reproduction in crickets, Gryllus bimaculatus de Geer: corpus allatum activity (in vitro) in females during adult life cycle. Physiol. Entomol. 10, 173-182

Koeppe, J.K., Fuchs, M., Chen, T.T., Hunt, L.-M., Kovalick, G.E. und Briers, T. (1985): The role of juvenile hormone in reproduction. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol.7 (Eds. G.A. Kerkut und L.I. Gilbert), Pergamon, Oxford, 166-203

Koeppe, J.K. und Kovalick, G.E. (1986): Juvenile hormone-binding proteins. In: Biochemical Actions of Hormones Vol. XIII. Academic Press, New York, 265-303

Koolman, J. und Spindler, K.-D. (1983): Mechanism of action of ecdysteroids. In: Endocrinology of Insects (Eds. R.G.H. Downer und H. Laufer), Liss, New York, 179-201

Kopeć, S. (1917): Experiments on metamorphosis of insects. Bull. Int. Acad. Cracovie B., 57-60

Kopeć, S. (1922): Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. Biol. Bull.42, 322-342

Koul, O. (1984a): Azadirachtin I. Interaction with the development of red cotton bugs. Entomol. exp. appl. 36, 85-88

Koul, O. (1984b): Azadirachtin II. Interaction with the reproductive behaviour of red cotton bugs. Z. ang. Ent. 98, 221-223

Koul, O., Amanai, K. und Ohtaki, T. (1987): Effects of azadirachtin on the endocrine events of Bombyx mori. J. Insect Physiol. 33, 103-108

Kraus, W., Bokel, M., Klenk, A. und Pöhnl, H. (1985): The structure of Azadirachtin and 22,23-Dihydro-23ß-Methoxy-azadirachtin. Tetrahedon Letters 26, 6435-6438

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Lagueux, M., Hetru, C., Goltzené, F., Kappler, C. und Hoffmann, J.A. (1979): Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 25, 709-723

Lagueux, M., Harry, P. und Hoffmann J.A. (1981): Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of Locusta. Mol. Cell. Endoc. 24, 325-338

Lagueux, M. (1983): Recherches sur les ecdystéroides dans les ovaires et les embryons d'insectes: revue des travaux chez l'orthoptère Locusta migratoria. Rev. Can. Biol. Exptl. 42, 215-221

Lanzrein, B., Gentinetta, V., Fehr, R. und Lüscher, M. (1978): Correlation between haemolymph juvenile hormone titre, corpus allatum volume, and corpus allatum in vivo and in vitro activity during oöcyte maturation in a cockroach (Nauphoeta cinerea). Gen. Comp. Endocrinol. 36, 339-345

Lanzrein, B., Wilhelm, R. und Buschor, J. (1981): On the regulation of the CA activity in adult females of the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea. In: Juvenile Hormone Biochemistry (Eds. G.E. Pratt und G.T. Brooks), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 147-161

Lanzrein, B., Gentinetta, V., Abegglen, H., Baker, F.C., Miller, C. und Schooley, D.A. (1985): Titers of ecdysone, 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone III throughout the life cycle of a hemimetabolous insect, the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea. Exp. 41, 913-917

Laurell, C.B. (1966): Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in antibody-containing agarose gel. In: Prot. Biol. Fluids 14, (Ed. H. Peters), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 499-502

Loher, W., Ruzo, L., Baker, F.C., Miller, C.A. und Schooley, D.A. (1983): Identification of the juvenile hormone from the cricket, Teleogryllus commodus, and juvenile hormone titre changes. J. Insect Physiol. 29. 585-589

Loughton, B.G. und Tobe, S.S. (1969): Blood volume in the African migratory locust. Can. J. Zool. 47, 1333-1336

Mauchamp, B., Lafont, R. und Jourdain, D. (1979): Mass fragmentographic analysis of juvenile hormone I levels during the last larval instar of Pieris brassicae. J. Insect Physiol. 25, 545-550

McCaffery, A.R. (1976): Effects of electrocoagulation of cerebral neurosecretory cells and implantation of corpora allata on oöcyte development in Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 22, 1081-1092

Mordue (Luntz), A.J., Evans, K.A. und Charlet, M. (1986): Azadirachtin, ecdysteroids and ecdysis in Locusta migratoria. Comp. Biochem. Physiol. 85C, 297-301

Poras, M., Baehr, J.C. und Cassier, P. (1983): Control of corpus allatum activity during the imaginal diapause in females of Locusta migratoria L. Int. J. Invert. Reprod. 6, 111-122

Porcheron, P., Papillon, M. und Baehr, J.C. (1982): Hormonal levels and protein variations during sexual maturation of Schistocerca gregaria; effect of rearing temperature. Exp. 38, 970-972

Pratt, G.E. und Tobe, S.S. (1974): Juvenile hormones radiobiosynthesized by corpora allata of adult female locusts in vitro. Life Sciences, 14, 575-586

Rankin, S.M. und Stay, B. (1984): The changing effect of the ovary on rates of juvenile hormone synthesis in Diploptera punctata. Gen. Comp. Endocrinol. 54, 382-388

Redfern, R.E., Warthen J.D., Uebel, E.C. und Mills, G.D. (1981): The antifeedant and growth-disrupting effects of azadirachtin on Spodoptera frugiperda and Oncopeltus fasciatus. In: Natural Pesticides from the Neem Tree. Proc. 1st Int. Neem Conf., Rottach-Egern, 1980 (Eds. H. Schmutterer, K.R.S. Ascher und H. Rembold), GTZ, Eschborn, 129-136

Redfern, R.E., Kelly, T.J., Borkovec, A.B. und Hayes, D.K. (1982): Ecdysteroid titres and molting aberrations in last-stage Oncopeltus nymphs treated with insect growth regulators. Pestic. Biochem. Physiol. 18, 351-356

Rembold, H. (1981): Modulation of JH III titer during the gonotrophic cycle of Locusta migratoria, measured by gas-chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry. In: Juvenile Hormone Biochemistry (Eds. G.E. Pratt und G.T. Brooks), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 11-20

Rembold, H. (1984): Secondary plant products in insect control, with special reference to the azadirachtins. In: Advances in Invertebrate Reproduction 3 (Ed. W. Engels), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 481-491

Rembold, H. (1986): Control of imaginal development by juvenile hormone. In: Advances in Invertebrate Reproduction 4 (Eds. M. Porchet, J.-C. Andries und A. Dhainaut), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 59-68

Rembold, H., Eder, J. und Ulrich, G.M. (1980): Inhibition of allatotropic activity and ovary development in Locusta migratoria by anti-brain anti-bodies. Z. Naturforsch. 35C, 1117-1119

Rembold, H., Sharma, G.K. und Czoppelt, C. (1981): Growth-regulating activity of azadirachtin in two holometabolous insects. In: Natural Pesticides from the Neem Tree. Proc. 1st Int. Neem Conf., Rottach-Egern, 1980 (Eds. H. Schmutterer, K.R.S. Ascher und H. Rembold), GTZ, Eschborn, 121-128

Rembold, H. und Sieber, K.-P. (1981): Inhibition of oogenesis and ovarian ecdysteroid synthesis by azadirachtin in Locusta migratoria. Z. Naturforsch. 36C, 466-469

Rembold, H. und Lackner, B. (1985): Convenient method for the determination of picomole amounts of juvenile hormone. J. Chromatogr. 323, 355-361

Rembold, H., Müller, T. und Uhl, M. (1987): Effect of azadirachtin on hormone titers during the gonotrophic cycle of Locusta migratoria. In: Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, 1987 (Eds. H. Schmutterer, K.R.S. Ascher und A. Hassanali), im Druck

Renucci, M. und Strambi, A. (1981): Evolution des ecdysteroides ovariens et hemolymphatiques au cours de la maturation ovarienne chez Acheta domesticus L. (Orthoptere). C.R. Acad. Sci. S III 293, 825-830

Renucci, M. und Strambi, C. (1983): Juvenile hormone levels, vitellogenin and ovarian development in Acheta domesticus. Exp. 39, 618-620

Reum, L. und Koolmann, J. (1979): Analysis of ecdysteroids by radioimmunoassay: comparison of three different antisera. Insect Biochem. 9, 135-142

Riddiford, L.M. und Truman, J.W. (1978): Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. In: Biochemistry of Insects (Ed. M. Rockstein), Academic Press, London, 308-355

Röller, H., Dahm, K.H., Sweeley. C.C. und Trost, B.M. (1967): Die Struktur des Juvenilhormons. Angew. Chemie 179, 190-191

Ruegg, R.P., Kriger, F.L., Davey, K.G. und Steel, C.G.H. (1981): Ovarian ecdysone elicits release of a myotropic ovulation hormone in Rhodnius (Insecta: Hemiptera). Int. J. Invert. Reprod. 3, 357-361

Ruegg, R.P., Orchard, I. und Davey, K.G. (1982): 20-hydroxyecdysone as a modulator of electrical activity in neurosecretory cells of Rhodnius prolixus. J. Insect. Physiol. 28, 243-248

Ruscoe, C.N.E. (1972): Growth-disruption effects of an insect antifeedant. Nature 236, 159-160

Schlagintweit, B. (1987): Nachweis und Anreicherung des allatotropen Hormons der Wanderheuschrecke, Locusta migratoria. Dissertation, Universität München.

Schlüter, U., Bidmon, H.J. und Grewe, S. (1985): Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, Manduca sexta. J. Insect Physiol. 31, 773-777

Schmutterer, H. und Rembold, H. (1980): Zur Wirkung einiger Reinfraktionen aus Samen von Azadirachta indica auf Fraßaktivität und Metamorphose von Epilachna varivestis (Col. Coccinellidae). Z. angew. Entomol. 2, 179-188

Schooley, D.A., Baker, F.C., Tsai, L.W., Miller, C.A. und Jamieson, G.C. (1984): Juvenile hormones 0, I, and II exist only in Lepidoptera. In: Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones (Eds. J.A. Hoffmann und M. Porchet). Springer Verlag, Heidelberg, 373-383

Sehnal, F. und Rembold, H. (1985): Brain stimulation of juvenile hormone production in insect larvae. Exp. 41, 684-685

Shalom, U. und Pener, M.P. (1984): Sexual behaviour without adult morphogenesis in Locusta migratoria. Exp. 40, 1418-1420

Sieber, K.-P. (1982): Untersuchungen über die Wirkung des Azadirachtins auf die Entwicklung und ihre Steuerung bei Locusta migratoria. Dissertation, Universität München.

Sieber, K.-P. und Rembold, H. (1983): The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 29, 523-527

Sliter, T.J., Sedlak, B.J., Baker, F.C. und Schooley, D.A. (1987): Juvenile hormone in Drosophila melanogaster. Identification and titer determination during development. Insect Biochem. 17, 161-165

Spindler, K.D., Beckers, C., Gröschel-Stewart, U. und Emmerich, H. (1978): Radioimmunoassay for arthropod moulting hormones, introducing a novel method of immunogen coupling. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1269-1275

Stay, B., Friedel, T., Tobe, S.S. und Mundall, E.C. (1980): Feedback control of juvenile hormone synthesis in cockroaches: possible role for ecdysterone. Science 207, 898-900

Stay, B. und Tobe, S.S. (1985): Structure and regulation of the corpus allatum. Adv. Insect Physiol. 18, 304-431

Steets , R. und Schmutterer, H. (1975): Einfluß von Azadirachtin auf die Lebensdauer und das Reproduktionsvermögen von Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae). Z. Pflkrankh. Pflschutz. 82,176-179

Strambi, C., Strambi, A., de Reggi, M.L., Hirn, M.H. und Delaage, M.A. (1981): Radioimmunoassay of insect juvenile hormones and of their diol derivates. Eur. J. Biochem. 118, 401-406

Subrahmanyam, B. und Rao, P.J. (1986): Azadirachtin effects on Schistocerca gregaria Forskal during ovarian development. Current Science 55, 534-538

Tobe, S.S. und Chapman, C.S. (1979): The effects of starvation and subsequent feeding on juvenile hormone synthesis and oöcyte growth in Schistocerca americana gregaria. J. Insect Physiol. 25, 701-708

Tobe, S.S., Girardie, J. und Girardie, A. (1982): Enhancement of juvenile hormone biosynthesis in locusts following electrostimulation of cerebral neurosecretory cells. J. Insect Physiol. 28, 867-871

Tobe, S.S., Ruegg, R.P., Stay, B.A., Baker, F.C., Miller, C.A. and Schooley, D.A. (1985): Juvenile hormone titre and regulation in the cockroach Diploptera punctata. Exp. 41, 1028-1034

Ulrich, G.M., Schlagintweit, B., Eder, J. und Rembold, H. (1985): Elimination of the allatotropic activity in locusts by microsurgical and immunological methods: evidence for humoral control of the corpora allata, hemolymph proteins, and ovary development. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 120-129

Watson, R.D., Whisenton, L.R., Bollenbacher, W.E. und Granger, N.A. (1986): Interendocrine regulation of the corpora allata and prothoracic glands of Manduca sexta. Insect Biochem. 16, 149-155

Weaver, R.J., Strambi, A. und Strambi, C. (1984): The significance of free ecdysteroids in the haemolymph of adult cockroaches. J. Insect Physiol 30, 705-711

Wigglesworth, V.B. (1934): The physiology of ecdysis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and "metamorphosis". Quart. J. Mic. Sci. 77, 191-222

Wigglesworth, V.B. (1936): The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of Rhodnius prolixus (Hemiptera). Quart. J. Mic. Sci. 79, 91-121

Wigglesworth, V.B (1940): The determination of characters at metamorphosis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). J. Exp. Biol. 17, 201-222

Wigglesworth, V.B. (1966): The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. Adv. Insect Physiol. 2, 248-336

Williams, C.M. (1947): Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm Platysamia cecropia. Biol. Bull. 93, 89-98

Zhu, X.X., Gfellert, H. und Lanzrein, B. (1983): Ecdysteroids during oögenesis in the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea. J. Insect Physiol. 29, 225-235

Lebenslauf

Am 20. Mai 1957 wurde ich als erste Tochter des Bäckermeisters Johann Uhl und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Oberacher, in Augsburg geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich den neusprachlichen Zweig des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums Königsbrunn, wo ich 1976 das Abitur ablegte.

Im Herbst 1976 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Ulm. 1978 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab, und im Frühjahr 1983 erhielt ich das Biologie-Diplom.

Im September 1983 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Maritnsried meine hier vorliegende Dissertation.